






BEST AVAILABLE COPY**Method for determining nucleotide identity through extension of immobilized primer****Patent number:** JP6505394T**Publication date:** 1994-06-23**Inventor:****Applicant:****Classification:****- international:** C12Q1/68**- european:** C12Q1/68B6; C12Q1/68D2G; C12Q1/68D4;
C12Q1/68E; C12Q1/68M4**Application number:** JP19920508312T 19920304**Priority number(s):** WO1992US01905 19920304; US19910664837
19910305; US19910775786 19911011**Also published as:** WO9215712 (A1)
 EP0576558 (A1)
 US6004744 (A1)
 FI933870 (A)
 FI20010223 (A)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP6505394T

Abstract of corresponding document: **US6004744**

The invention concerns a reagent composition that employs at least two different terminators of a nucleic acid template-dependent primer extension reaction to determine the identity of a nucleotide base at a specific position in a nucleic acid of interest. The invention also concerns an immobilized method for determining such identification. The invention may be used to determine the presence or absence of a specific nucleotide sequence in a sample. It may also be employed in determination of genotype and in the identification of different alleles.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-505394

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)6月23日

(51) Int.Cl.⁴

C 12 Q 1/68

識別記号

庁内整理番号

F I

Z 7823-4B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願平4-508312	(71) 出願人	モレキュラー トゥール, インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)3月4日		アメリカ合衆国, メリーランド 21224,
(85) 国際文提出日	平成5年(1993)8月21日		バルチモア, イースタン アベニュー 5210
(86) 国際出願番号	PCT/US92/01905	(72) 発明者	ゴーレット, フィリップ
(87) 国際公開番号	WO92/15712		アメリカ合衆国, メリーランド 21030,
(87) 国際公開日	平成4年(1992)9月17日		コッキスビル, ウェスタン ラン ロード 801
(31) 優先権主張番号	664, 837	(72) 発明者	ナッブ, マイケル アール,
(32) 優先日	1991年3月5日		アメリカ合衆国, メリーランド 21218,
(23) 優先権主張国	米国 (US)		バルチモア, カルバート ストリート 2830
(31) 優先権主張番号	775, 786	(74) 代理人	弁理士 宇井 正一 (外4名)
(32) 優先日	1991年10月11日		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 ターミネーター複合物を利用するオリゴヌクレオチドのポリメラーゼ伸長による核酸分類

(57) 【要約】

本発明は核酸鋳型依存性プライマー伸長反応の少なくとも2種類のターミネーターを含んで成る試薬組成物に関する。本発明はまた、対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチドの同一性を決定するための方法に関する。本発明は更に核酸のサンプル中の特定のヌクレオチド配列の有無を決定するための方法に関する。本発明は更に核酸を含むサンプル中の種々の対立遺伝子を同定するための方法に関する。本発明は更に1又は複数の特定の遺伝子座での生物のゲノタイプを決定するための方法に関する。

請求の範囲

1. 水性組成物と、該組成物にプライマー伸長反応の少なくとも2種類の異なるターミネーターの混合物とを含んで成り、各ターミネーターは該組成物におけるこのプライマーの3'末端のすぐ隣りの、且つ、その下流の、対をなしていないヌクレオチド塩基の同一性に基づいて依存する状況において伸長反応を特異的に停止することが可能であり、そしてこれらのターミネーターのうちの少なくとも1種は検出マーカによってラベルされている試薬組成物。
2. 前記組成物が4種類の異なるターミネーターを含んで成る請求項1に記載の組成物。
3. 2種類のターミネーターがそれぞれ別の検出マーカによってラベルされている請求項2に記載の組成物。
4. 3種類のターミネーターがそれぞれ別の検出マーカによってラベルされている請求項2に記載の組成物。
5. 4種類のターミネーターがそれぞれ別の検出マーカによってラベルされている請求項2に記載の組成物。
6. 前記(複数の)ターミネーターがヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を含んで成る、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。
7. 前記(複数の)ターミネーターがジデオキシヌクレオチドを含んで成る、請求項6に記載の組成物。
8. 前記(複数の)ターミネーターがアラビノシド三リン酸を含んで成る、請求項6に記載の組成物。
9. 前記(複数の)ターミネーターが4dITP、4dCTP、4dGTP又は4dATPのうちの1又は複数の混合物を含んで成る、請求項7に記載の組成物。
10. 別の検出マーカそれぞれがアイソトープ性ラベル化成分、

(d) 工程(c) 由来の伸長プライマーの3'末端にて存在している検出マーカの同一性を決定し、それにより対象の塩基における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定すること、を含んで成る方法。

14. 対象の試薬における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定する方法であって、

(a) 対象の試薬が二本鎖であるなら、かかる試薬を含むサンプルを処理せしめて特定の位置にわたって対をなしていないヌクレオチド塩基を識別するか、または対象の試薬が一本鎖であるなら工程(b)を直接採用し、

(b) 工程(a) 由来のサンプルをハイブリダイゼーション条件のもとで、対象の試薬において存在している特定すべきヌクレオチド塩基のすぐ隣りのヌクレオチド塩基の順とハイブリダイズすることであるナリゴヌクレオチドプライマーと接触させて前記プライマーと対象の試薬との二重体を形成せしめ、従って特定すべきヌクレオチド塩基は前記二重体における前記プライマーの3'末端のすぐ隣りにあるこの試薬における第1の対をなしていない塩基となり、

(c) 工程(b) 由来の二重体を請求項2に記載の試薬(ここで前記ターミネーターのうちの1種のみが検出マーカを有している)と下流の条件、即ち、前記試薬の中に存在している相補性ターミネーターと特定すべきヌクレオチド塩基との塩基対合を可能とし、且つ、前記プライマーの3'末端にて前記ターミネーターが一体化されるよう伸長抑制性プライマー伸長反応が起こることを可能とする条件のもとで接触させ(目的の結果は、このプライマーが1種類のターミネーターによって伸長されることにある)；そして

(d) 工程(c) を更に3回繰り返す(ここでこの4通りの平行反応工程それぞれにおいて、4種のターミネーターのうちの1種類の

特許平6-505394 (2)

塩基塩、蛍光団、タンパク質成分、又はアイソトープ性ラベル化成分、蛍光団、蛍光団もしくはタンパク質成分が運搬される成分である、請求項1～5のいずれか1項に記載の試薬。

11. 別の検出マーカそれぞれが別の蛍光団である、請求項10に記載の試薬。

12. 前記試薬がピロエスファクゼを含んで成る、請求項1～5のいずれか1項に記載の試薬。

13. 対象の試薬における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定する方法であって、

(a) 対象の試薬が二本鎖であるなら、かかる試薬を含むサンプルを処理せしめて特定の位置にわたって対をなしていないヌクレオチド塩基を識別するか、または対象の試薬が一本鎖であるなら工程(b)を直接採用し、

(b) 工程(a) 由来のサンプルをハイブリダイゼーション条件のもとで、対象の試薬において存在している特定すべきヌクレオチド塩基のすぐ隣りのヌクレオチド塩基の順とハイブリダイズすることであるナリゴヌクレオチドプライマーと接触させて前記プライマーと対象の試薬との二重体を形成せしめ、従って特定すべきヌクレオチド塩基は前記二重体における前記プライマーの3'末端のすぐ隣りにあるこの試薬における第1の対をなしていない塩基となり、

(c) 工程(b) 由来の二重体を請求項2に記載の試薬と下流の条件、即ち、前記試薬の中に存在している相補性ターミネーターと特定すべきヌクレオチド塩基との塩基対合を可能とし、且つ、前記プライマーの3'末端にて前記ターミネーターが一体化されるよう伸長抑制性プライマー伸長反応が起こることを可能とする条件のもとで接触させ(目的の結果は、このプライマーが1種類のターミネーターによって伸長されることにある)；そして

づつがラベルされている)；そして

(d) この4通りの平行伸長抑制性プライマー伸長反応の生成物のうちのいずれが前記プライマーの3'末端にて存在している検出マーカを有しているかを決定して、対象の試薬における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定すること、を含んで成る方法。

15. 試薬のサンプル中の特定のヌクレオチド塩基の有無を決定するための方法であって、

(a) 試薬のサンプルが二本鎖の試薬を含むなら、かかる試薬のサンプルを処理せしめて一本鎖の試薬を識別するか、又は試薬のサンプルが一本鎖の試薬のみを含むなら工程(b)を直接採用し、

(b) 工程(a) 由来のサンプルをハイブリダイゼーション条件のもとで、特定のヌクレオチド配列が存在しているならばその特定のヌクレオチド配列とハイブリダイズすることの可能なナリゴヌクレオチドプライマーと接触させて前記プライマーとこの特定のヌクレオチド配列との二重体を形成せしめ、

(c) 存在しているならば工程(b) 由来の二重体を請求項2に記載の試薬と下流の条件、即ち、前記試薬の中に存在している相補性ターミネーターと前記プライマーの3'末端のすぐ下流にある対をなしていない試薬のヌクレオチド塩基との塩基対合を可能とし(このプライマーはこの試薬における前記の特定のヌクレオチド配列とハイブリダイズしている)、且つ、前記プライマーの3'末端にてターミネーターが一体化されるよう伸長抑制性プライマー伸長反応が起こることを可能とする条件のもとで接触させ；そして

(d) 工程(c) 由来のプライマーの3'末端での検出マーカの有無及び同一性を決定して、試薬のサンプル中の前記の特定のヌクレオチド配列の有無を決定すること；

特許平6-505394 (3)

を含んで成る方法。

15. 核酸のサンプル中の特定のヌクレオチド配列の有無を決定するための方法であって:

(a) 核酸のサンプルが二本鎖の核酸を含むなら、かかる核酸のサンプルを解離せしめて一本鎖の核酸を調得するか、又は核酸のサンプルが一本鎖の核酸のみを含むならば工程(b)を直接採用し;

(b) 工程(a)由来のサンプルをハイブリダイゼーション条件のもとで、特定のヌクレオチド配列が存在しているならばその特定のヌクレオチド配列とハイブリダイズすることの可能なオリゴヌクレオチドプライマーと接触させて前記プライマーとこの特定のヌクレオチド配列との二重体を形成せしめ;

(c) 存在しているならば工程(b)由来の二重体を請求項2(ここで前記ターミナーターのうちの1個のみが検出マーカーを有している)に配置の試薬と下記の条件、即ち、前記試薬の中に存在している相補性ターミナーターと前記プライマーの3'末端のすぐ下流にある対をなしていない隣接のヌクレオチド塩基との塩基対合を可視とし(このプライマーはこの検型における前記の特定のヌクレオチド配列とハイブリダイズしている)、且つ、前記プライマーの3'末端にてターミナーターが一体化されるよう隣接塩基性プライマー伸長反応が起こることを可視とする条件のもとで接触させ;そして

(d) 工程(c)を更に3回繰り返す(ここでこの4通りの平行反応工程それぞれにおいて、4種のターミナーターのうちの一箇部分がラベルされている);そして

(e) この4通りの平行検型依存性プライマー伸長反応の生成物におけるプライマーの3'末端での検出マーカーの有無及び同一性を決定して、この核酸のサンプル中の前記の特定のヌクレオチド配

列の有無を決定すること;

を含んで成る方法。

17. 核酸を含んで成るサンプルを分類する方法であって、1又は複数の特定の位置それぞれに存在しているヌクレオチド塩基又は複数の塩基を同定することを含んで成り、かかるヌクレオチド塩基はそれぞれ、請求項13又は14に記載の方法を用いて同定され、そしてかかる特定の位置それぞれは異なるプライマーを用いて決定される方法。

18. 各位置での各ヌクレオチド塩基又は複数の塩基の同一性を確立して決定するか、又は塩基の位置での複数のヌクレオチド塩基の同一性を同時に決定する、請求項17に記載の方法。

19. 核酸を含むサンプルを分類する方法であって、1又は複数のヌクレオチド配列の有無を決定することを含んで成り、かかるヌクレオチド配列それぞれは請求項13又は14に記載の方法によって決定される方法。

20. 核酸を含むサンプルを分類する方法であって:

(a) 1又は複数の特定のヌクレオチド配列の有無を決定し(ここでかかるヌクレオチド配列それぞれの有無は請求項13又は14に記載の方法によって決定される)、そして

(b) 1又は複数の特定の位置に存在しているヌクレオチド塩基又は複数の塩基を同定する(ここでかかるヌクレオチド塩基それぞれは、請求項13又は14に記載の方法を用いて同定され、そしてかかる特定の位置は異なるプライマーを用いて決定される)。

ことを含んで成る方法。

21. 核酸を含むサンプル中の塩基の対立塩基子を同定するための方法であって、1又は複数の特定の位置それぞれに存在しているヌクレオチド塩基又は複数の塩基を同定することを含んで成り、かか

るヌクレオチド塩基それぞれは請求項13又は14に記載の方法によって同定する方法。

22. 1又は複数の特定の塩基子座での生物のゲノタイプを決定するための方法であって:

(a) ゲノムDNAを含むサンプルを生物から調得し;そして

(b) 対象の位置における1又は複数の特定の位置それぞれにて存在しているヌクレオチド塩基又は複数の塩基を同定して(ここでかかる塩基又は複数の塩基は請求項13又は14に記載の方法を用いて同定される)、塩基の対立塩基子を同定する、即ち、1又は複数の特定の塩基子座での生物のゲノタイプを決定すること;

を含んで成る方法。

23. 工程(c)における検型依存性プライマー伸長反応を経る条件をある程度、両方の検型依存性酵素の存在により作り上げる、請求項13又は14に記載の方法。

24. 前記検型依存性酵素がE. coli DNAポリメラーゼIもしくはその「クローン フラグメント」、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ(「シーケンダー」)、*S. Aureus* DNAポリメラーゼ、レトロウイルス逆転写酵素、又はそれらの組合せである、請求項13に記載の方法。

25. 対象の核酸がデオキシリボ核酸、リボ核酸、又はデオキシリボ核酸とリボ核酸との共重合体である、請求項13又は14に記載の方法。

26. 前記プライマーがオリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、又はデオキシリボ核酸とリボ核酸との共重合体である、請求項13又は14に記載の方法。

27. 前記酵素がデオキシリボ核酸であり、前記プライマーがオリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、又はデオ

キシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとの共重合体であり、そして前記検型依存性酵素がT4 DNAポリメラーゼである、請求項13又は14に記載の方法。

28. 前記酵素がリボ核酸であり、前記プライマーがオリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、又はデオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとの共重合体であり、そして前記検型依存性酵素が逆転写酵素である、請求項13又は14に記載の方法。

29. 前記酵素がデオキシリボ核酸であり、前記プライマーがオリゴリボヌクレオチドであり、そして前記酵素がT4 DNAポリメラーゼである請求項13又は14に記載の方法。

30. 前記酵素がリボ核酸であり、前記プライマーがオリゴリボヌクレオチドであり、そして前記酵素がT4 DNAポリメラーゼである請求項13又は14に記載の方法。

31. 工程(c)におけるプライマー伸長反応の際に、前記検型に、この酵素の3'末端にてターミナーターを付加することによってキャップを付し、ここで前記ターミナーターは検型依存性プライマー伸長反応を停止せしめることのできる、請求項13又は14に記載の方法。

32. 前記ターミナーターがジデオキシヌクレオチドである、請求項31に記載の方法。

33. 対象の核酸がインビトロで酵素的に合成、インビトロで酵素的に合成、又は非酵素的に合成されたものである、請求項13又は14に記載の方法。

34. 前記オリゴヌクレオチドプライマーがインビトロで酵素的に合成、インビトロで酵素的に合成、又は非酵素的に合成されたものである請求項13又は14に記載の方法。

35. 前記オリゴヌクレオチドプライマーが、一酸化されていない

特表平6-505394 (4)

試薬及び/又は対象の核酸からこのプライマーのアフィニティー分離を可能とする1又は複数の成分を含んで成る、請求項13又は14に記載の方法。

36. 図様に結合しているストレプトアビジンに対するビオチンの結合性を介して、一体化されていない試薬及び/又は対象の核酸からオリゴヌクレオチドプライマーをアフィニティー分離を可能とするビオチンを前記プライマーが含んで成る、請求項35に記載の方法。

37. 図様に結合している核酸において存在している特異性配列に対する塩基対合を介して、一体化されていない試薬及び/又は対象の核酸からオリゴヌクレオチドプライマーをアフィニティー分離を可能とする321配列を前記プライマーが含んで成る、請求項13又は14に記載の方法。

38. 対象の核酸が、一体化されていない試薬及び/又はプライマーからの対象の核酸のアフィニティー分離を可能とする1又は複数の成分を含んで成る、請求項13又は14に記載の方法。

39. 図様に結合しているストレプトアビジンに対するビオチンの結合性を介して、一体化されていない試薬及び/又はプライマーから対象の核酸をアフィニティー分離を可能とするビオチンを前記対象の核酸が含んで成る、請求項38に記載の方法。

40. 図様に結合している核酸において存在している特異性配列に対する塩基対合を介して、一体化されていない試薬及び/又はプライマーから対象の核酸をアフィニティー分離を可能とする321配列を前記対象の核酸が含んで成る、請求項13又は14に記載の方法。

41. 前記オリゴヌクレオチドプライマーが検出マーカーによってラベルされている、請求項13又は14に記載の方法。

せる、請求項13又は14に記載の方法。

53. 前記産性条件が塩、アルカリ、ホルムアルデ、尿素、グリオキナル、尿素及びそれらの組合せを含んで成る、請求項53に記載の方法。

54. 前記産性条件が0.2NのNaOHによる処理を含んで成る、請求項53に記載の方法。

55. 前記生物が植物、微生物、ウイルス又は鳥類である、請求項48に記載の方法。

56. 前記生物が哺乳動物又は無脊椎動物である、請求項48に記載の方法。

57. 前記生物が哺乳動物である、請求項48に記載の方法。

58. 前記哺乳動物が人間である、請求項57に記載の方法。

59. 前記哺乳動物が馬、犬、牛、豚、鶏又は羊である、請求項57に記載の方法。

42. 前記オリゴヌクレオチドプライマーが、前記試薬中に存在しているか、又は対象の核酸に結合しているかの検出マーカーとも異なる、請求項41に記載の方法。

43. 前記対象の核酸が検出マーカーによってラベルされている、請求項13又は14に記載の方法。

44. 前記対象の核酸が、前記試薬中に存在しているか、又は対象の核酸に結合しているかの検出マーカーとも異なる、請求項43に記載の方法。

45. 前記対象の核酸が天然でないヌクレオチド類似体である、請求項13又は14に記載の方法。

46. 前記天然でないヌクレオチド類似体がデオキシリボシン又は7-デアザ-2'-デオキシグアノシンを含んで成る、請求項45に記載の方法。

47. 前記対象の核酸がポリヌラーゼ逆転反応によって合成される、請求項13又は14に記載の方法。

48. 前記サンプルが、生物に由来するゲノムDNA、そのRNA断片、又はそのRNA断片より作られたcDNAを含んで成る請求項13又は14に記載の方法。

49. 前記サンプルが生物に由来するゲノムDNA、そのRNA断片、又はそのRNA断片より作られたcDNAを含んで成る請求項13又は14に記載の方法。

50. 前記プライマーが、特定すべき塩基のすぐ隣りの既知の塩基配列と実質的相補的である、請求項13又は14に記載の方法。

51. 前記プライマーが、特定すべき塩基のすぐ隣りの既知の塩基配列と完全に相補的である、請求項13又は14に記載の方法。

52. 適当な産性条件を利用することにより、工程(c)におけるプライマー伸長反応の後に対象の核酸から前記プライマーを分離さ

明 細 書

ターミナー複合物を利用するオリゴヌクレオチドのポリヌラーゼ伸長による核酸分析

本発明は1991年3月5日由願の米国特許出願第 664,697号の一部係属出願であり、それは本明細書に参考として導入れる。

発明の背景

本発明は核酸配列の決定の分野に属する。核酸配列の決定は1通りの一般的な状況に利用することから成る。第1に、核酸配列の決定は特定の塩基子要素の分析を決定するために利用である。第2に、核酸配列の決定は存在している特定の塩基子要素の特定のタイプを決定するために利用である。様々な塩基子要素が通常存在している。多くの技術が、(1)特定の核酸配列の存在を調べるために、及び(2)核酸配列の相同性セグメントを特定させてそれらのセグメントが同一であるか又は1又は複数のヌクレオチドが異なるかどうかを調べるために開発されてきている。これらの技術の実施の用途には遺伝診断、感染診断、法医学的、発元の決定及びゲノムマッピングが含まれる。

一般に、サンプル中の核酸及びそのサブタイプの決定は特異的核酸ハイブリダイゼーションの技術である。オリゴヌクレオチドプローブをサンプル中の核酸と高濃度条件のもとでアニールせしめ、そして有期にアニールしたプローブを次に検出する技術に依存している (Spiegelman, *J. of Molecular Biology* 第 213巻、頁48(1964)を参照のこと)。

321 セグメントを特定させるための最も具体的な方法は各セグ

特表平6-505394 (5)

ントの完全ヌクレオチド配列を決定することにある。ヒトの遺伝子における突然変異を研究するためにどのようにシーケンシングが利用されてきたかの例はEngelkeらのProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:544-548(1988)及びWangらNature 330:384-386(1987)に示されている。現時点で、わずかなDNAセグメントのみを対比するために長いシーケンシングを利用することは高価的ではなく、なぜなら配列情報を決定、解釈及び対比するのに必要な作業は時間がかかるからである。

DNA配列の配列より生ずるDNAの多形性(polymorphism)についての一般に利用されているスクリーンは、DNAを制限エンドヌクレアーゼで消化し、次いで得られるフラグメントをBosteinらBiochem. Biophys. Res. Commun. 87:814-831(1980)及びWhiteらSci. Am. 258:40-48(1988)に記載のサザンブロットにより分析することより構成される。エンドヌクレアーゼの制限配列に影響を及ぼす突然変異はその部位での酵素切断を妨げ、それ故そのDNAの切断パターンを変えてしまう。それらのDNAは制限フラグメントの長さにおける相違について調べることにより対比される。この方法(制限フラグメント長多形性マッピング又はRFLPマッピングとして知られる)に関する主たる問題は、制限エンドヌクレアーゼによる切断に影響を及ぼさない突然変異がそれが検出できないことにある。従って、数多くの突然変異はこの方法によって見逃されている。JeffreyらCell, 18:1-18(1979)の一つの研究は、9.7%の突然変異のみがヒトDNAの40,000塩基対の領域において存在するものと予測されることを決定するにすぎなかった。他の問題は、制限フラグメント長多形性を決定するのに用いる方法、特にサザンブロット分析を包括する技術が非常にめんどうであることにある。

任意のDNAセグメントにおける特定の突然変異を決定するための

技術はWallaceらMol. Cell Res., 9:279-284(1981)に記載されている。これは分析すべきDNA(標的DNA)の相補性ラベル化オリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイズを包括する。一つの標的対照対合しか含まないものでさえもDNA二本鎖の熱的不安定性に基づき、プローブと完全に相補する標的DNAを1個のヌクレオチド相違しか相違しない標的DNAから区別するのに差違温度法が利用される。LandegrenらScience 251:1077-1080(1992)に記載の同様の技術においては、オリゴヌクレオチドプローブをベクターで作製してそれらの連結部位が突然変異について分析すべきDNAの部位に対応するようにしている。次にこれらのオリゴヌクレオチドを分析すべきDNAにハイブリダイズさせる。いづれかのオリゴヌクレオチドと標的DNAとのこの連結領域での標的対照対合はDNAリガーゼによるこれら2本のオリゴヌクレオチドプローブの首端の連結を助けてしまう。

A. 核酸ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応における核酸の標的対合はほとんどの核酸の分析及び診断的技術の基礎を成す。実際、核酸ハイブリダイゼーションのパラメーターをその基礎とする技術は、核酸タンブルの配列複雑度が高い場合にはあまりよく機能しない。これはある程度、一種のヌクレオチド変換により生ずるハイブリッドの安定性におけるわずかな熱力学的相違、及びプローブを長くすることにより特異性を高めることがこの体系的安定性を更に小さくする結果を有することに基づく。従って核酸ハイブリダイゼーションは一般に分析及び診断目的のためにいくつかの他の選択的又は高化的手段と組合せられる。

ハイブリダイゼーションを測定技術としてのハイブリダイズ分子のサイズ分別と組合せることは一般的分離手段の1つである。サ

イズ選別はハイブリダイゼーションの前に行うことができる。最もよく知られた事象サイズ選別技術はサザンブロッティングである(Bostein, E.; Nihalan, L. Nucleic Acids Res. 8:313(1980)を参照のこと)。この技術においては、DNAタンブルを、制限酵素による消化に付して、各断片によって特徴的正確なヌクレオチド配列の部位での又はその付近でのホスホジエステル骨格における二本重鎖間をもちあわしている。得られるDNAフラグメントの不均質混合物を次にゲル電気泳動により分け、酸性させ、そして乾燥へと移し、ここでそれらをラベル化探知プローブを用いてその場でハイブリダイゼーション分析にかける。ラベル化プローブに相補する配列を含むフラグメントはハイブリダイズしたラベルのバンドとして目視で又はデンストローメーターで示される。この方法の改良はDNA分子についてのノーザンブロッティングである。サイズ選別は数多くの技術におけるハイブリダイゼーションの後、特にハイブリッド形成技術により、サイズ分析にかける前にプローブ/核酸ハイブリッドを固定硬化に付することにより利用されてもいる。

B. 二重体、プライマー：標的の複合体のポリメラーゼ伸長

プライマーとDNA標的とのハイブリッドは、これらのハイブリッドのポリメラーゼ伸長によって分析することができる。この方法の改良はポリメラーゼ連鎖反応であり、その特異物は逆平行プライマーの核酸ハイブリダイゼーション反応、それに続くDNAポリメラーゼによる標的の増幅によって提供される(Evansら, Science 222:487-491(1988)を参照のこと)。2通りのハイブリダイゼーション反応に関して選択することにより、この方法は単純なハイブリダイゼーション反応にのみ依存する技術に欠ける特異性を提供する。

プライマー依存性DNAポリメラーゼは長い間一般的に、標的に対して相補的なヌクレオチドの付加について低いエラー率を有するこ

とで知られてきた。この特徴は子孫に有害な影響を及ぼさずであろう遺伝的誤りの防ぎために生物界において必須である。この酵素学的反応に固有な特異性は双鎖的な核酸分離実験法である「サンガー」又はジデオキシヌクレオチド停止シーケンシング方法に基づいて修正(利用されている。1つのタイプのサンガー-DNAシーケンシング法は通常のDNA前駆体である4種のデオキシヌクレオチド三リン酸の混合物、及びこの4種の考えられるジデオキシヌクレオチド三リン酸のうちの1種が、そのヌクレオチドのリボース組成成分の3'炭素原子に結合しているヒドロキシル基の代わりに水素を有するものを利用する。5'から3'方向(「下流」)におけるDNA伸長はこのヒドロキシル基を必要とする。従って、ジデオキシヌクレオチドがこの成長DNA鎖に取り込まれると、更なる伸長が妨げられてしまう。この混合物中の1種のジデオキシヌクレオチドにより、DNAポリメラーゼはプライマー：標的の複合体に依存する様々な長さの分子の混合物を生成せしめることができ、その全てはこの4種の考えられるヌクレオチドのうちの1種の付加の後に停止したものである。一連の4つの確立した反応(それぞれ異なるジデオキシヌクレオチドによる)はフラグメントの入れ子(nested)セットを作り上げ、全てはプライミングDNA分子の同じ5'末端から始まり、そして考えられる全ての3'ヌクレオチド位にて終結している。

DNAの分析におけるジデオキシヌクレオチド三リン酸とポリメラーゼの他の用途は分子の3'末端のラベル化を包括する。ある突然変異の出現はマキヤム-ベルグマン法を利用する。DNA分子のその3'末端からのシーケンシングのための手段を提供する。この技術において、完全出し3'末端を有する分子を放射性ジデオキシ-ATPの存在下において末端トランスフェラーゼにより処理する。1種の放射性ヌクレオチドを付加し、この分子をシーケンシングに

特許第6-505394 (B)

造するようにする。ラベル化ジデオキシヌクレオチドを利用するDNAシーケンシングの両方の方法は分類の情報を得るために反応生成物の電気泳動分離を必要とする。ほとんどの方法は各分類決定のために4つの独立ゲルトラックを必要とする。

下記の2つの特許はプライマー伸長及びラベル化ヌクレオチドを利用する技術を分類する他の方法を述べている。Beady (米国特許第4,656,127号)は、対象の塩基配列の領域に相補性であるプライマーであって、その3'末端が、ヌクレオチドにおける置換が生じうる位置に比してプライマーを標識する方法を述べている。このハイブリッドを、DNAポリメラーゼ及び4種のデオキシヌクレオチド三リン酸(そのうちの1種はラベル化ヌクレオチドである)の存在下においてプライマー伸長に付する。次にこのハイブリッドを、エキソヌクレアーゼで処理してそのヌクレオチド分解作用によっての産物としてデオキシヌクレオチドを利用できないもの(例えば、L-glutamine)のエキソヌクレアーゼを用いて消化する。その特許における置換ヌクレオチドがこの反応混合物中の一種のデオキシヌクレオチドに相補性であるなら、得られる伸長化プライマー分子は特異的なサイズとなり、且つ、エキソヌクレアーゼに阻害となる。デオキシヌクレオチドを有さないハイブリッドは分解されてしまうであろう。標識化されていない分子を除くための選別は通常、ゲル電気泳動技術によって決定される。

VaryとBlasmond (米国特許第4,851,331号)はBeadyと似たような方法を述べており、そこではプライマーの最後のヌクレオチドは対象の置換ヌクレオチドに対応している。このプライマーの3'末端ヌクレオチドにおいてのプライマーと隣接の置換は伸長によって阻害されないため、トレーサーヌクレオチドの一体化の量において阻害な量が正常なプライマー伸長条件のもとで生ずるであろう。こ

の方法はDNAポリメラーゼ、例えばDNA逆転写酵素であって関連の3'~5'エキソヌクレアーゼ活性を有さないものの利用に依存する。

Beady及びVaryとBlasmondの方法は欠点を有している。Beadyの方法は有用であるが、標識化されていないハイブリッドを消化する第2の別の酵素系の必要性によりめんどうである。Varyの方法は別々の反応生成物を作りあげないことにより複雑である。「不良」プライミングはかかる系において阻害なノイズをもたらす。これは真性シグナルと区別するのが難しいであろう。

本発明は特定のヌクレオチドについての機能を分類するBeady及びVaryとBlasmondの方法に関連する問題を解決する。プライマー伸長及びDNAポリメラーゼを利用する方法により、本発明はそのプライマー自体よりも一貫性高い別の分子物質をもたらすであろう。数多くの方法、特にポリメラーゼ連鎖反応を利用する方法において、第1工程において対象の核酸を特異するために用いるタイプの反応は、次の検出工程において用いることもできる。最後に、異なる検出成分(例えば異なるスペクトル特性を有する蛍光物質)によってラベルされているターミネーターにより、全ての配列決定実験のために1種の検出のみを利用することが可能となるであろう。更に、反応後に残ったプライマーを分離する技術を利用すると、複数の塩基位置での配列決定実験を同じチューブの中で行うことができる。

Hillisによる最近の論文(Scientific American, 1998年4月、頁36-68)は、明らかに実施されていないであろう、二本鎖DNAの断片における塩基対の同一性の決定の実験を展示している。Hillisは4タイプのジデオキシヌクレオチド三リン酸と、放射性ラベルされた1タイプのジデオキシヌクレオチド三リン酸の利用を展示している。

発明の概要

本発明は、本発明と、核酸断片依存性プライマー伸長反応の少なくとも3種類の異なるターミネーターの混合物とを混合して成る試薬混合物を提供する。それぞれのターミネーターは、このプライマーの3'末端に結合し、且つ、その下流にある、核酸における結合をなしていないヌクレオチド塩基の同一性に依存して検出される状況において伸長反応を特異的に停止せしめることが可能である。更に、このターミネーターの少なくとも一種は検出マーカーによりラベルされている。

本発明は更に、水性塩液と、核酸断片依存性プライマー伸長反応の4種類の異なるターミネーターの混合物とを混合して成る試薬混合物を提供する。それぞれのターミネーターは、上記のように伸長反応を特異的に停止せしめることが可能であり、そしてこれらのターミネーターのうちの1種、2種、3種又は4種が検出マーカーによりラベルされている。

本発明は更に前記した試薬であって、そのターミネーターがヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、ジデオキシヌクレオチド又はアラビノース三リン酸を含んで成る試薬を更に提供する。本発明はまた試薬であって、そのターミネーターが1又は複数のジデオキシアデノシン三リン酸(dATP)、ジデオキシシトシン三リン酸(dCTP)、ジデオキシグアノシン三リン酸(dGTP)、ジデオキシチミン三リン酸(dTTP)又はジデオキシウリジン三リン酸(dUTP)を含んで成る試薬を提供する。

本発明は更に対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための方法を提供する。第1に、もし対象の核酸が二本鎖であるならばかかる核酸を含むサンプルを処理して特定の位置にわたって対をなしていないヌクレオチド塩基を露出する。

本発明は核酸断片の検出、塩基列の決定、及び個人及びその身元の特定に有用でありうる核酸配列の分析を可能とする。

これらの目的のために数多くの方法が開発されている。有用であるにもかかわらず、かかる方法にはめんどうであり、且つ、費用がかかる。一般にゲル電気泳動、プロベイング、ハイブリダイゼーション及びオートラジオグラフィ又は非アイソトープ基質のような技術の組合せを包含する。より幅広い核酸分析の利用を可能とするより簡単な技術が要望されている。更に、核酸を基質とする試薬は、現状最も費用のかかる実験手順に属し、そしてこの理由のためルーチンベースには利用されることができていない。最後に、現状の技術は大量のサンプルの分析、従って更には費用を下げることを可能とするのに必要であろう自動化手順に適用できない。

本発明は核酸物質のゲル電気泳動サイズ選別に頼ることなく生物学的サンプル中の核酸の検出又は特異的に利用する方法を提供する。この特徴はこの方法を簡単に容易に適用できることをもたらす。従って比較的低価格にて大量のサンプルを分析することを可能にする。核酸は生命の本質的な要素であるため、各生物又は細胞は核酸の特定可能な配列によって個別に特異化される。従って、これらの特異的な核酸配列を抽出することによって、特定の生物の存在を特定する又は一定のサンプルの生物起源を裏付けることが可能となる。

特許6-505394 (7)

もし対象の核酸が一本鎖であるならこの工程は必要ではない。第2に、対象の核酸を含むテンプレートをハイブリダイゼーション条件のもとでオリゴヌクレオチドプライマーと接触させる。このオリゴヌクレオチドプライマーは、測定すべきヌクレオチド塩基のすぐ隣りの、対象の核酸に存在しているヌクレオチド塩基の値とハイブリダイズして、プライマーと対象の核酸との二重体を形成することができ、従って測定すべきヌクレオチド塩基は、プライマーと対象の核酸との二重体における。このプライマーの3'末端のすぐ下流にあるこの位置における最初の対をなしていない塩基となる。従って、例えばBis-ホリメラーゼにより触媒される、一つのヌクレオチドのかたわらで生ずる二重体におけるオリゴヌクレオチドプライマーの両端の伸長は、測定すべきヌクレオチド塩基に付加されたヌクレオチドの正しい塩基対合に依存する。

プライマーと対象の核酸との二重体を次に4種のラベル化ターミナーを含む試薬と接触させる。各ターミナーは異なる検出可能なマーカによりラベルされている。プライマーと対象の核酸との二重体を、この試薬の中に存在する補綴性ターミナーと測定すべきヌクレオチド塩基との塩基対合を可能にし、且つ、このプライマーの3'末端においてこのターミナーが一体化されるような鎖型保存性プライマー伸長反応の発生を可能とする条件のもとで該試薬と接触させる。目的(ネット)の核酸は、オリゴヌクレオチドプライマーが1個のターミナーによって伸長されることにある。次に、伸長化プライマーの3'末端に存在している検出マーカの同一性を決定する。検出マーカの同一性は、どのターミナーが対象の核酸における次の塩基と塩基対合したかを示す。このターミナーは対象の核酸における次の塩基と相補するため、対象の核酸における次の塩基の同一性がそれによって決定される。

本発明はまた対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための別の方法を提供する。この異なる方法は4種のターミナーのうち1個のターミナーのみが検出可能なマーカを有するものを含む試薬を利用する。

本発明はまた、1又は複数の特定の位置それぞれにて存在している塩基又は複数の塩基を測定することを含んで成る核酸のテンプレートの分割方法を提供し、かかるヌクレオチド塩基それぞれは前記した通りの対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の一致を決定するための方法のうちのいづれかを利用して測定される。対象の核酸におけるそれぞれの特定の位置は異なるプライマーを用いて決定される。各位置での各ヌクレオチド塩基又は複数の塩基の同一性を独立して決定することができ、又は個々の位置でのヌクレオチド塩基の測定を同時に決定することができる。

本発明は更に、1又は複数の特定の位置それぞれにて存在している塩基又は複数の塩基を測定することを含んで成る、核酸を含むテンプレート中の個々の対立遺伝子を測定するための方法を提供する。各ヌクレオチドの同一性は前記した対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための方法により決定される。

本発明はまた、1又は複数の特定の位置子座での生物のゲノタイプを決定するための方法を提供し、この方法はゲノムDNAを含むサンプルを生物から獲得し、決いて対象の核酸における1又は複数の特定の位置それぞれに存在するヌクレオチド塩基又は複数の塩基を測定することを含んで成る。かかる塩基それぞれの同一性は前記した通りの対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための方法のいづれかを利用して決定される。ヌクレオチド塩基の一致は個々の対立遺伝子を決定、それ故に1又は複数の

の遺伝子座での生物のゲノタイプを決定する。

図面の簡単な説明

図1. オリゴヌクレオチド/塩基ゲル上での分別後のラベル化DNA生成物のオートラジオグラフ。パネルAは伸長オリゴヌクレオチド100又は101に付けられたオリゴヌクレオチドプライマー102に基づく「A」伸長反応の生成物を示している。パネルBは伸長オリゴヌクレオチド100又は101にアニールさせたオリゴヌクレオチドプライマー102に基づく「B」伸長反応の生成物を示す。パネルCはラングムアールに基づく伸長後の、パネルBと同一の生成物を示す。両者、オリゴデオキシヌクレオチド102は異なる標識を有することなく、Midland Certified Reagentsより供給されたものをを使用した。メインバンドの上下のマイナーバンドはおそらく不完全反応、又はオリゴヌクレオチドの逐次合成中に生ずる副反応に基づく汚染物であろう。「A」伸長反応及び「B」伸長反応の定量的については、発明の詳細な説明中の「A. 一連の方法」を参照のこと。

図2. PCR生成物における配列多型性の検定。伸長プライマー、検出プライマー及び分子クローン(プラスミド)記号を示す鎖型多型性DNA配列。各プライマーに同じ、異なるDNA配列の一方又は他方の塩への結合部位を下線を付して示し、そしてDNA合成の方向を矢印で示す。鎖型配列の番号を右側の欄外に示す。位置114及び119での多型性位置を太文字と2通りの可能な多型性間のスラッシュとで示す。

図3. PCR生成物に基づくゲル分析した多型性試験のオートラジオグラム。本明細書に記載の通り多型性試験の過程及び実験におけるp123、p124又はp114のPCR生成物由来の試料を検出プライマーTGL100及びTGL100により分析に付した。反応生成物をオリゴヌクレオチド/塩基DNAシーケンシングゲルでサイズにより分別し、そして【**5】-デオキシデオキシアデノシン-リン酸の一体化をオ

オートラジオグラフィによりアッセイした。

図4. プライマーTCL346及びTCL391のラベル化伸長生成物のゲル電気泳動分析。ビーズ結合型オリゴヌクレオチド鎖TCL392と、TCL346又はTCL391との全長プライマー鎖型複合体を4種の異なる【G-C-A-T】ジデオキシヌクレオチドトリリン酸混合物によりプライマー伸長ラベル反応にかけた。ラベル化プライマーDNAを洗淨ビーズから遊離させ、次いで8%のポリアクリルアミド/8Mの尿素のDNAシークエンシングゲル上で電気泳動にかけ(2,500voltsのプライマー/レーン)、次いでオートラジオグラフィにより分析した。プライマーTCL346についての4本のレーンはラベル化が44C混合物により優先的に生ずることを示し、TCL392鎖型におけるTCL346の3'末端に隣り合う次の対をなしていない塩基がCであることを示している(実験例4に示す配列を参照のこと)。プライマーTCL391についての4本のレーンはラベル化が44T混合物により優先的に生ずることを示し、TCL392鎖型におけるTCL391の3'末端に隣り合う次の対をなしていない塩基がAであることを示している。図5. ビーズに結合した全長鎖型複体のオートラジオグラフィ分析。図5に記載の伸長反応の生成物を含むビーズ懸濁物を濾紙の上にスポットし(スポット当たり1µoleのプライマー)、そして全ビーズ結合化放射能をアッセイするためにX線フィルムに曝露させた。示す通り、TCL346は44C混合物からのラベルを主に取り込み、そしてTCL391は44T混合物からのラベルを主に取り込んだ。

図6. 哺乳動物DNAのPCR増幅化多量体産物。PCRプライマーTCL240(ビオチン化)及びTCL289(ビオチン化していない)を用いてゲノムDNAのサンプルから増幅せしめた327塩基対の哺乳動物DNAのセグメントを示す。3種類のホモ接合体、E28184(ゲノタイプAA)及びE28214(ゲノタイプBB)由来のDNAのサンプルを異

特表平6-505394 (B)

図7に記載の分析に付した。この塩基子座のA対立塩基子の完全DPA配列を、このA配列の下位の塩基により示すB対立塩基子配列がA対立塩基子配列と異なっている箇所を多量体部位と共に示す。後述のプライマーTCL398はビオチン化プライマーから伸長させた鎖型複体と塩基対をなして示す。A対立塩基子について、TCL398の3'末端のすぐ下位の対をなしていない塩基塩基はCであり、そしてB対立塩基子については、この塩基はAである。従って、A対立塩基子は44C混合物によってのみTCL398のラベル化がもたらされ、そしてB対立塩基子は44T混合物によってのみラベル化がもたらされるであろう。

図7. 2種の異なるホモ接合体に由来するPCR生成物のゲル電気泳動分析。3種の鎖型、E28184及びE28214からゲノムDNA(真核上リ塩基)を増幅させるためにプライマーTCL340及びTCL289を用いた。図7に記載する通り、ビーズ結合型PCR増幅化鎖型にアミールさせたプライマーTCL398に関する伸長反応の生成物を、図5に記載した通りの8%のポリアクリルアミド/8Mの尿素のDNAシークエンシングゲル上で電気泳動により分析した。鎖型E28184(ゲノタイプAA:44C混合物よりラベル化が予測)については、4種の異なる44HTTラベル化反応に由来する250µoleの伸長化プライマーを示す。鎖型E28214(ゲノタイプBB:44T混合物よりラベル化が予測)については、4種の異なる44HTTラベル化反応に由来する25、75及び250µoleの伸長化プライマーの増加を示す。

図8. TCL398プライマー伸長反応に由来する生及びE28184増幅化放射能性のオートラジオグラフィ分析。プライマーTCL398は、実験例5並びに図7及び8に述べする通り、鎖型E28184及びE28214のゲノタイプを分析するために用いた。全ビーズ結合化放射能性は、75µoleのプライマーを含むビーズ懸濁物を濾紙上に直接スポットし、強い

でこのスポット中のラベルのオートラジオグラフィ像によって決定した。TCL398プライマーに特異的に結合した放射能性は、このビーズを電気的に固定化し、実験例4及び5に記載の通りプライマーを8%の尿素で洗淨させ、次いで75µoleに相当する量を濾紙上にスポットすることによって決定した。これらのスポット中のラベルもオートラジオグラフィにより検出した。

図9. 種々のゲノタイプのヒトDNAサンプル由来の非対称型PCRにより作られた一本鎖複製に基づくC8Aからのデータを示す。調べたDPA配列は37アルファ領域のアミノ酸21についてコードする多量体配列でのE1A 37A1塩基子座(Horsh, S.G.E. とBodmer, J.G., E1A Class I Nucleotide Sequences, 1991, Human Immunol. 21, 207-227 (1991))に由来し、そしてこの図の中央に示している。プライマーのすぐ下位のヌクレオチドの固定は同接合体化後法により行われ、そして37 DNAポリメラーゼによって挿入されたヌクレオチドに対応するウェルにおいて電色の発現として開示された。ホモ接合体は1つの鎖型ウェルしかなく、ヘテロ接合体は2つであった。C8Aプライマーの配列を裏印で示し、その塩基はオリゴヌクレオチドの5'であり、そしてその塩基は3'である。

図10. 種々のゲノタイプのウマDNAサンプル由来の非対称型PCRにより作られた一本鎖複製に基づくC8Aからのデータを示す。調べたDPA配列は37アルファ領域のアミノ酸50についてコードする多量体配列でのE1A 37A1塩基子座(Horsh, S.G.E. とBodmer, J.G., E1A Class I Nucleotide Sequences, 1991, Human Immunol. 21, 207-227 (1991))に由来し、そしてこの図の中央に示している。

図11. 種々のゲノタイプのウマDNAサンプル由来の非対称型PCRにより作られた一本鎖複製に基づくC8Aからのデータを示す。調べたDPA配列ははじめにクローニングしたゲノム断片に関するヌクレオチド

番号22での多量体配列での不明の塩基子座J185(未知塩基)に由来し、そして図の中央に示す。この位置で、「B」対立塩基子は一部の追加塩基を含む。従って、別のヌクレオチド位置番号208と対比させてプライマー207により調べた。どちらにしても、両者の調査結果は正確な分類をもたらした。

図12. ウマ塩基子座J185の定量的C8Aの塩基のデータを示す。高質の増幅後、「Vapor」モデル96穴分光光度計(Molecular Devices, Inc., Menlo Park, CA)においてマイクロプレートを定量的に読み取った。既知の1000単位/分においてVaporとして読み取った。11ホモ接合体(ベタ狼狗)、11ヘテロ接合体(白狼狗)及び11ホモ接合体(黒狼狗)の一本鎖複製についてのC8A塩基を測るウェルにおいて分析した4種のビオチン化44HTTに関して示す。既得した限値を各ウェルの上に示す。

発明の詳細な説明

本発明は、水性懸液と、核酸鎖型塩基性プライマー伸長反応の少なくとも2種類の異なるターミネーターの混合物とを含んで成る試薬組成物を提供する。それぞれのターミネーターは、このプライマーの3'末端に隣接し、且つ、その下位にある、鎖型における対をなしていないヌクレオチド塩基の同一性に依存して結合する状況において伸長反応を特異的に停止せしめることが可能である。更に、このターミネーターの少なくとも一方は放出可能ヌcleoターによりラベルされている。

本発明は更に、水性懸液と、核酸鎖型塩基性プライマー伸長反応の4種の異なるターミネーターの混合物とを含んで成る試薬組成物を提供する。それぞれのターミネーターは、上記のように伸長反応を特異的に停止せしめることが可能であり、そしてこれらのターミ

特表平6-505394 (9)

ネーターのうちの少なくとも1個が検出マーカーによりラベルされている。

本発明は更に、水性懸液と、該懸液にプライマー伸長反応の4種の異なるターミネーターの混合物とを混合して成る試料懸液物を提供し、それぞれのターミネーターは前記の通り伸長反応を特異的に停止せしめることができ、そしてターミネーターの2、3又は4個が異なる検出可能マーカーによってラベル化されている。

本発明は更に前記した試薬であって、そのターミネーターがヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、ジデオキシヌクレオチド又はアラビノース三リン酸を含んで成る試薬を更に提供し、本発明はまた試薬であって、そのターミネーターが1又は複数のジデオキシアデノシン三リン酸(dATP)、ジデオキシシトシン三リン酸(dCTP)、ジデオキシグアノシン三リン酸(dGTP)、ジデオキシチミジン三リン酸(dTTP)又はジデオキシウリジン三リン酸(dUTP)を含んで成る試薬を提供する。

本発明は更に上記した試薬であって、そのターミネーターに付加された検出マーカーそれぞれがアイソトープ性ラベル化成分、発色団、蛍光団、タンパク質成分、又は成分であってそれにアイソトープ性ラベル化成分、発色団、蛍光団もしくはタンパク質成分が付加されるものである試薬を提供する。本発明は個々の検出マーカーそれぞれが異なる蛍光団である試薬も提供する。

本発明は前記した試薬がピロホスファターゼを更に含んで成る試薬も提供する。

発明した試薬は2重以上の連続ターミネーターより成り、ここでこの連続ターミネーターのうちの1個以上は同定可能なようにタグされている。この試薬は1個以上のオリゴヌクレオチドプライマーに相補性である対象の核酸配列を分断する3'ポリメラーゼプライ

マー伸長反応に利用することができ、これはポリメラーゼ伸長させたプライマーを連続ターミネーター試薬より化学的に又は物理的に分け、次いで実際の付加物を分析することにより行われる。異なる伸長を阻止する任意の種類のターミネーター、例えばジデオキシヌクレオチド三リン酸が利用できる。ターミネーターをラベル化及び検出するためにいくつかの手法が利用できる：(1)放射活性、及びオートラジオグラフィもしくはシンチレーション計測のいづれかによるその検出、(2)蛍光もしくは吸収分光学、(3)質量分析、又は(4)タンパク質成分を用いる検出活性。各ターミネーターの同一性は種々に、即ち、1つずつ決定できる。加えて、各ターミネーターの独立分析を可能とする方法に、4個までのターミネーターの一体化を同時に分析することを利用とする。

本発明は更に対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための方法を提供し、第1に、もし対象の核酸が二本鎖であるならばかかる核酸を含むサンプルを処理して特定の位置にわたって対をなしていないヌクレオチド塩基を識別する。もし対象の核酸が一本鎖であるならばこの工程は必要ではない。第2に、対象の核酸を含むサンプルをハイブリダイゼーション条件のもとでオリゴヌクレオチドプライマーと接触させる。このオリゴヌクレオチドプライマーは、同定すべきヌクレオチド塩基のすぐ隣りの、対象の核酸に存在しているヌクレオチド塩基の順とハイブリダイズして、プライマーと対象の核酸との二重体を形成することができ、従って同定すべきヌクレオチド塩基は、プライマーと対象の核酸との二重体における、このプライマーの3'末端のすぐ下流にあるこの位置における最初の対をなしていない塩基となる。従って、例えば3'ポリメラーゼにより切断される、一つのヌクレオチドのかたわらで生ずる二重体におけるオリゴヌクレオチドプライマーの隣

の伸長は、同定すべきヌクレオチド塩基に付加されたヌクレオチドの正しい塩基対合に依存する。

プライマーと対象の核酸との二重体を次に4種のラベル化ターミネーターを含む試薬と接触させる。各ターミネーターは異なる検出可能マーカーによりラベルされている。プライマーと対象の核酸との二重体を、この試薬の中に存在する相補性ターミネーターと同定すべきヌクレオチド塩基との塩基対合を可能にし、且つ、このプライマーの3'末端においてこのターミネーターが取り込まれるような伸長阻害性プライマー伸長反応の発生を可能とする条件のもとで該試薬と接触させる。目的の結果は、オリゴヌクレオチドプライマーが1個のターミネーターによって伸長されることにある。次に、伸長化プライマーの3'末端に存在している検出マーカーの同一性を決定する。検出マーカーの同一性は、どのターミネーターが対象の核酸における次の塩基と塩基対合したかを示唆する。このターミネーターは対象の核酸における次の塩基と相補するため、対象の核酸における次の塩基の同一性がそれによって決定される。

本発明は更に対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための別の方法を提供し、第1に、もし対象の核酸が二本鎖であるならばかかる核酸を含むサンプルを処理して特定の位置にわたって対をなしていないヌクレオチド塩基を識別する。もし対象の核酸が一本鎖であるならばこの工程は必要ではない。第2に、対象の核酸を含むサンプルをハイブリダイゼーション条件のもとでオリゴヌクレオチドプライマーと接触させる。このオリゴヌクレオチドプライマーは、同定すべきヌクレオチド塩基のすぐ隣りの、対象の核酸に存在しているヌクレオチド塩基の順とハイブリダイズして、プライマーと対象の核酸との二重体を形成することができ、従って同定すべきヌクレオチド塩基は、プライマーと対象の

核酸との二重体における、このプライマーの3'末端のすぐ下流にあるこの位置における最初の対をなしていない塩基となる。

プライマーと対象の核酸との二重体を次に4種のラベル化ターミネーターを含む試薬と接触させ、ここでそれらのターミネーターのうちの1個のみが検出マーカーを有するプライマーと対象の核酸との二重体を、この試薬の中に存在する相補性ターミネーターと同定すべきヌクレオチド塩基との塩基対合を可能にし、且つ、このプライマーの3'末端においてこのターミネーターが一体化されるような伸長阻害性プライマー伸長反応の発生を可能とする条件のもとで該試薬と接触させる。目的の結果は、オリゴヌクレオチドプライマーが1個のターミネーターによって伸長されることにある。

プライマーと対象の核酸との二重体を次に3種類の異なる試薬と接触させ、ここでこの3通りの平行反応工程それぞれにおいて、4種のターミネーターのうちの1個ずつがラベルされている。次に、この3通りの平行伸長阻害性プライマー伸長反応の生成物を、どの生成物が検出マーカーを有しているかを決定するために調べる。検出マーカーを有する生成物は、どのターミネーターが対象の核酸における次の塩基と塩基対合したかを示す。ターミネーターは対象の核酸における次の塩基に相補するため、これにより対象の核酸における次の塩基の同一性が決定される。

対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するこの両方の方法は、プライマーと対象とのハイブリダイゼーションの後にプライマーをラベルしている。もし伸長阻害性阻害剤がエキソヌクレアーゼ機能を有さないなら、ターミネーターによるラベル化が起こるためにこのプライマーの3'末端を塩基対合すべきである。

本発明は更に対象のサンプルにおける特定のヌクレオチド配列の

特表平6-505394 (10)

有無を決定するための方法を提供する。第1に、もし対象の核酸が二本鎖であるならばかかる核酸を含むサンプルを処理して特定の位置にわたって対をなしていないヌクレオチド塩基を識別する。もし対象の核酸が一本鎖であるならばこの工程は必要ではない。第2に、核酸のサンプルをハイブリダイゼーション条件のもとでオリゴヌクレオチドプライマーと接触させる。このオリゴヌクレオチドプライマーは、もし特定のヌクレオチド配列が存在しているならばその特定のヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができ、このプライマーと特定のヌクレオチド配列との二重体を形成することができる。

存在するならば、プライマーと特定のヌクレオチド配列との二重体を次に4重のラベル化ターミネーターを含む試薬と接触させる。各ターミネーターは異なる放出可能マーカによってラベルされている。存在するならば、プライマーと特定のヌクレオチド配列との二重体を試薬と、試薬中に存在している相補的ターミネーターとこのプライマーの3'末端の下流の対をなしていないヌクレオチド塩基とを塩基対合させ（このプライマーはこの位置における特定のヌクレオチド配列とハイブリダイズしている）、そして鎖型依存性プライマー伸長反応が起こることを可能とする条件のもとで接触させて、このプライマーの3'末端にてターミネーターを一体化させる。放出マーカの有無はこのプライマーがこの位置にハイブリダイズしたかを示唆する。もし放出マーカが存在していないならば、このプライマーはこの位置にハイブリダイズしていない、従って特定のヌクレオチド配列がこの核酸サンプルの中に存在していないことになる。もし放出マーカが存在しているならば、このプライマーは位置にハイブリダイズしていない、従って特定のヌクレオチド配列がこの核酸サンプルの中に存在していることになる。

の有無は、プライマーが位置にハイブリダイズしているかどうかを示唆する。もし放出マーカがどの生成物においても存在していないならば、このプライマーは位置にハイブリダイズしていないことになり、従って特定のヌクレオチド配列が核酸サンプルの中に存在していないことになる。もし放出マーカがいくつかの生成物において存在しているならば、このプライマーは位置にハイブリダイズしていることになり、従って、特定のヌクレオチド配列が核酸サンプルの中に存在していることになる。

対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための方法及び核酸のサンプル中の特定のヌクレオチド配列の有無の決定のための方法の種々のバージョンが可能である。第1バージョンにおいては、鎖型はデオキシリボ核酸であり、プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとの共重合体であり、そして鎖型依存性酵素はDNAポリメラーゼである。このバージョンにおいては、鎖型はデオキシリボ核酸であり、プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとの共重合体であり、そして鎖型依存性酵素は逆転写酵素である。このバージョンはDNA生成物を提供する。第3のバージョンにおいては、鎖型はデオキシリボ核酸であり、プライマーはオリゴリボヌクレオチドであり、そして酵素はDNAポリメラーゼである。このバージョンはDNA生成物を提供する。第4のバージョンにおいては、鎖型はリボ核酸であり、プライマーはオリゴリボヌクレオチドであり、そして鎖型依存性酵素は、RNAレプリカーゼである。このバージョンはRNA生成物を提供する。

好ましくは、プライマー伸長反応を行う前に、この鎖型の3'末

本発明は更に核酸のサンプルにおける特定のヌクレオチド配列の有無を決定するための別の方法を提供する。第1に、もし対象の核酸が二本鎖であるならばかかる核酸を含むサンプルを処理して特定の位置にわたって対をなしていないヌクレオチド塩基を識別する。第2に、核酸のサンプルをハイブリダイゼーション条件のもとでオリゴヌクレオチドプライマーと接触させる。このオリゴヌクレオチドプライマーは、もし特定のヌクレオチド配列が存在しているならばその特定のヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができ、このプライマーと特定のヌクレオチド配列との二重体を形成することができる。

存在するならば、プライマーと特定のヌクレオチド配列との二重体を次に4重のラベル化ターミネーターを含む試薬と接触させる。ターミネーターのうちの一種のものが放出可能マーカによってラベルされている。存在するならば、プライマーと特定のヌクレオチド配列との二重体を試薬と、試薬中に存在している相補的ターミネーターとこのプライマーの3'末端の下流の対をなしていないヌクレオチド塩基とを塩基対合させ（このプライマーはこの位置における特定のヌクレオチド配列とハイブリダイズしている）、そして鎖型依存性プライマー伸長反応が起こることを可能とする条件のもとで接触させる。目的の結果は、プライマーの3'末端でのターミネーターの一体化である。

存在しているならば、プライマーと特定のヌクレオチド配列との二重体の二重体を次に4重の異なる試薬と接触させる。ここでこの4重の平行反応工程において、4重のターミネーターのうちの1個づつがラベルされている。次に、この4重の平行の鎖型依存性プライマー伸長反応の生成物を、存在しているならば、どの生成物が放出マーカを有しているかの決定にかける。放出マーカの同一性

端へのターミネーターの付加によってこの位置にキャップを付す。このターミネーターは鎖型依存性プライマー伸長反応を停止させることができる。この鎖型はキャップが付されて異なるラベル化ターミネーターがこの鎖型の3'末端に付加されないようになっている。伸長反応は鎖型ではなく、プライマーに基づいて生ずるべきである。鎖型にキャップを付するためのターミネーターとしてジデオキシヌクレオチドが利用される。

対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための方法の別の改良性は、伸長反応後に適当な酸性条件を用いて対象の核酸からプライマーを分けることにある。この酸性条件は、アルカリ、ホルムアルデヒド、尿素、グリオキサール、酢酸及びそれらの組合せを含んで成りうる。酸性条件は3.0MのpHによる処理も含んで成りうる。

対象の核酸は天然のヌクレオチド類似体、例えばデオキシイノシン又は7-デアザ-2'-デオキシリボアノシンを含んで成りうる。これらの類似体はDNA二重体を不安定にし、従って鎖の完全な分離を伴うことなく二本鎖サンプル中でプライマーのアンダーリング及び伸長反応が生ずることを可能にする。

核酸のサンプルは任意の組織に由来してよい。核酸のサンプルは天然でも合成でもよい（即ち、インビトロで鎖型的に合成されたもの）。核酸のサンプルはデオキシリボ核酸、リボ核酸、又はデオキシリボ核酸とリボ核酸との共重合体を含んで成りうる。対象の核酸はデオキシリボ核酸、リボ核酸、又はデオキシリボ核酸とリボ核酸との共重合体であってよい。対象の核酸はインビトロで鎖型的に合成、インビトロで鎖型的に合成、又は非鎖型的に合成されたものでよい。対象の核酸又は核酸の核酸を含むサンプルは生物に由来するゲノムDNA、そのDNA断片、又はそのDNA断片より断片したDNAを含む

特表平6-505394 (11)

んで成りうる。対象の核酸又は複製の核酸を含むサンプルは生物に由来するゲノムDNA、そのRNA転写体、又はそのRNA転写体より調製したcDNAを含んで成りうる。また、対象の核酸又は複製の核酸はポリメラーゼ連鎖反応により合成されたものである。よい。

このサンプルは任意の生物から採取できる。本発明の方法を適用することのできる生物のいくつかの例は植物、微生物、ウイルス、鳥類、脊椎動物、無脊椎動物、哺乳動物、人間、馬、犬、牛、豚、豚又は羊である。

対象の核酸は一体化されなかった試薬及び/又はプライマーからの対象の核酸のアフィニティー分離を可能にする1又は複製の成分を含んで成りうる。対象の核酸は一体化されなかった試薬及び/又はプライマーからの核酸のアフィニティー分離を可能とするビオチンを含んで成ることができ、この分離は固相支持体に結合されたストレプトアビジンへのビオチンの結合を介する。対象の核酸の配列はBlaI配列であって、固相支持体に結合された核酸において存在している複製ととの塩基対合を介して、一体化されなかった試薬及び/又はプライマーから対象の核酸のアフィニティー分離を可能とするものを含んで成ることができ、対象の核酸は検出マーカーでラベル化されている。この検出マーカーはこの試薬の中に存在している又はプライマーに結合した他の検出マーカーとも異なっている。よい。

該オリゴヌクレオチドプライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、又はデオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとの共置換体でありうる。このオリゴヌクレオチドプライマーは天然で合成されてもよい。このオリゴヌクレオチドプライマーはインビトロで化学的に合成、インビトロで酵素的に合成、又はインビトロで非酵素的に合成されたものでよい。このオリゴヌ

クレオチドプライマーは検出マーカーでラベル化されている。よい；この検出可能マーカーは試薬の中に存在している、又は対象の核酸に結合している任意の検出可能マーカーと異なっている。更に、このオリゴヌクレオチドプライマーは、特定すべきヌクレオチド塩基のすぐ隣りの、且つ、上述の対象の核酸において存在しているヌクレオチドとハイブリダイズ又はアニールすることが可能である。よい。所望のハイブリダイゼーションを達成するための手段は、特定すべき塩基のすぐ隣りの既知の塩基配列と実質的に相補的な、又は完全に相補的な複製体存在プライマーを獲得することにある。

オリゴヌクレオチドプライマーは一体化されなかった試薬及び/又は対象の核酸からのプライマーのアフィニティー分離を可能にする1又は複製の成分を含んで成りうる。オリゴヌクレオチドプライマーは一体化されなかった試薬及び/又は対象の核酸からのプライマーのアフィニティー分離を可能とするビオチンを含んで成ることができ、この分離は固相支持体に結合されたストレプトアビジンへのビオチンの結合を介する。オリゴヌクレオチドプライマーの配列はBlaI配列であって、固相支持体に結合された核酸において存在している複製ととの塩基対合を介して、一体化されなかった試薬及び/又は対象の核酸からプライマーのアフィニティー分離を可能とするものを含んで成ることができ、

本発明はまた、1又は複製の特定の位置それぞれに存在している塩基又は複製の塩基を特定することを含んで成る核酸のサンプルの分類方法を提供し、かかるヌクレオチド塩基それぞれは前記した通りの対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための方法のうちのいづれかを適用して決定される。対象の核酸におけるそれぞれの特定の位置異なるプライマーを用いて決定される。各位置での各ヌクレオチド塩基又は複製の塩基の

同一性を独立して決定することができ、又は個々の位置でのヌクレオチド塩基の特定を同時に決定することができる。

本発明はまた、1又は複製の特定のヌクレオチド配列の有無を決定することを含んで成る核酸のサンプルを分類する別の方法を提供し、かかるヌクレオチド配列のそれぞれの有無は、前記した通りか通りの核酸のサンプル中の特定のヌクレオチド配列の有無を決定するための方法のいづれかを適用して決定される。

本発明はまた、核酸を含むサンプルを分類する別の方法を提供する。第1に、1又は複製の特定のヌクレオチド配列の有無を決定する。かかるヌクレオチド配列のそれぞれの有無は、前記した通りか通りの核酸のサンプル中の特定のヌクレオチド配列の有無を決定するための方法のいづれかを適用して決定される。次に、1又は複製の特定の位置に存在しているヌクレオチド塩基又は複製の塩基を特定する。かかる塩基それぞれは、前記した通りの対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための方法のいづれかを適用して決定される。

本発明は更に、核酸を含むサンプルにおける個々の対立遺伝子を特定するための方法を提供し、この方法は1又は複製の特定の位置それぞれの塩基又は複製の塩基を特定することを含んで成る。各ヌクレオチド塩基の同一性は、前記した通り、対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための方法により決定される。

本発明はまた、1又は複製の特定の塩基子配列での生物のゲノタイプを決定するための方法を提供し、この方法はゲノムDNAを含むサンプルを生物から調製し、次に対象の核酸における1又は複製の特定の位置それぞれに存在しているヌクレオチド塩基又は複製の塩基を特定することを含んで成る。かかる塩基それぞれの特定は、

前記した通りの対象の核酸における特定の位置でのヌクレオチド塩基の同一性を決定するための方法のいづれかを適用して決定される。ヌクレオチド塩基の同一性は個々の対立遺伝子を決定し、それら1又は複製の特定の塩基子配列での生物のゲノタイプを決定する。

通常オリゴヌクレオチドプライマー、並びに付随した3'から5'に至るヌクレオチド塩基を有する又は有さない3'末端ポリヌクレオチド、並びに塩基塩及び核酸塩基との結合における塩基対合は、通常ハイブリダイゼーション条件のもとで、通常プライマー延伸技術を用いたなら、核酸の伸縮又は分離のためのキットとして利用される。プライマー延伸及び末端ヌクレオチド付加分析を自動化するため、本発明はアフィニティー選別及びポリヌクレオチド伸長を可能にするように改良されたオリゴヌクレオチドを利用する。合成オリゴヌクレオチドの5'末端及び内部ヌクレオチドは個々のアフィニティー選別手法を可能とする数多くの様々な方法、例えばビオチン化において改良される。これらのアフィニティー選別は伸長させた(複製の)オリゴヌクレオチドの分析を促進せしめるために下記の2通りの方法においてターミネーター混合物と共に用いることができる。

(1) もし第一のアフィニティー基(複製の)オリゴヌクレオチド上に用いるなら、(複製の)オリゴヌクレオチドは、一体化されていないターミネーター試薬から分離することができる。これは物理的又はサイズの選別の必要をなくす。

(2) 複製のアフィニティー基を用いるなら、複製のオリゴヌクレオチドはターミネーター試薬から分離されて同時に分析されることができ、これは伸縮反応直後直後の核酸物質の分析又はより多くの核酸配列情報を可能とする。

この(複製の)アフィニティー基はプライムに付されたオリゴヌ

特許第6-505394 (12)

クレオチド上にある必要はなく、極端、特異性上であってよい。このプライマーがアフィニティー選別工程中に特異的に水素結合している限り、このことは一体化されていないターミネーター試薬からのプライマーの効率的な分離を可能とするであろう。このことは付加成分の好適な選別のために、プライマー上に自由な部位を授け得る利点をも有している。例えば、このプライマーの3'末端はそれに適当な置換基、例えばロダミンを結合させることにより改変されることができ、このことはアフィニティー選別工程の後にプライマー-標的複合体におけるプライマーの量が簡単に定量されることを可能にする。従って3'末端化ターミネーターの置換基はアニール化プライマーの定量に對して標準化される。

このオリゴヌクレオチドプライマー及び標的は任意の長さもしくは配列であってよく、DNAもしくはRNAであってよく、又はそれらの任意の改変体であってよい。しかしながら必要ならば、対象の標的配列に対するプライマー-標的ハイブリダイゼーションを最適化する条件を導く。

標的依存性プライマー-伸長反応の発生のための条件は、適当な標的依存性標的の存在下によりある程度作られる。いくつかの適当な標的依存性標的はDNAポリメラーゼである。このDNAポリメラーゼは標的のタイプでありうる。しかしながら、このDNAポリメラーゼはプライマー及び標的依存性でなくてはならない。例えば、Exo DNAポリメラーゼもしくはその「クレノウフラグメント」、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ（「シーケーナーゼ」）、Exo DNAポリメラーゼ（Exonuclease）DNAポリメラーゼ、又はレトロウイルス逆転写酵素が利用される。DNAポリメラーゼ、例えばT3又はT7 DNAポリメラーゼはいくつかのプロトコールにおいて用いられることである。ポリメラーゼに依存して、種々の条件を利用しなくては

ならず、そして種々の温度域がハイブリダイゼーション及び伸長反応のために必要でありうる。

本発明の試薬は、特定のハイブリダイゼーション及びポリメラーゼ選別条件のもとでプライマー又は標的のプライマーに対するターミネーターの3'末端付加の分析を促進せしめることにより、対象の標的の分離を可能とする。ヌクレオチドミリン酸誘導体としてのターミネーター-置換基のみを利用することは、ポリメラーゼ反応におけるプライマーの3'末端に対する1個のヌクレオチド誘導体のみの付加を誘発する。同時に4個のターミネーターを全て用いることは、精度、厚さ、既知量の制御を簡便にする。

1又は複数のターミネーターを特異的にラベル化することにより、伸長化プライマー配列を決定することができる。原理的には、もし複数のターミネーターが特異的にラベル化されているなら、複数の反応生成物を一箇の反応器内に分析することができる。

（標的の）オリゴヌクレオチドプライマー又は（標的の）標的、3'伸長反応には影響を及ぼさないアフィニティー選別を可能とする成分を特異的に付与することにより、反応後に、一体化されていないターミネーター、この試薬の他の成分及び/又は標的標的から（標的の）伸長生成物を分離せしめることができる。もし標的のアフィニティー因子を利用するなら、複数のオリゴヌクレオチドを伸長反応器内分析することができる。

原理的には、4個の異なるラベル化ターミネーターと、異なる長さのつなげられた数多くのプライマー又は標的との組合せは、数多くの異なる標的配列の同時分離を可能とする。

この分析反応における特異性は、

- (1) オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションの温度、及び
- (2) 単一標的伸長により誘発される配列特異性

によって決定される。

A. 一般的方法

1. オリゴデオキシヌクレオチドのビオチニル化。

第一アミノ基によってその5'末端が終結しているオリゴデオキシヌクレオチドをMidland Certified Reagents, Midland, Texasより仕入れた。ビオチン-N-ヒドロキシスクレンイミドの標準体であるビオチン-N-ヒドロキシスクレンイミド（Glen Research, Inc., Palo Alto, California）を用いてこれらをビオチニル化した。典型的には、このオリゴヌクレオチド（3ナノモル）を0.1MのNa₂CO₃/Na₂CO₃（pH 9）100μlに溶かし、次いで2.5mgのビオチン-N-ヒドロキシスクレンイミドを含むM₂（Glen Research, Inc.）を加えた。この混合物を室温で一晩インキュベートした。次にこれを0.5で希釈した5mlのセファチャックスのC-25カラム（「Pharmacia」-Pharmacia）に通した。DNAを含む溶液は、4μlのアリコート（標準のエチウムブロムド（2μl/ml）と混合し、次いでDNA誘発性蛍光物質をUVトランスイルミネーターでモニターすることによって測定する。主反応スチクルを220nmにてUV吸収により検出する。DNAを含むチューブをプールし、Centricon-3マイクロコンセンレーター（Biacore）で濃縮し、次いで再びセファチャックスに通した。

（「B」）-ビオチンの活性M-280 ストレプトアビジンダイナミーズ（Dyna）への結合の阻止を、オリゴヌクレオチドのビオチニル化の程度を定量的にアッセイするために用いた。エッペンダルフチューブ及びビベットチップをシリコン処理した。0.1MのNaCl 10μl中の放射量（5~10μCi）のビオチンラベル化オリゴヌクレオチドを、0.1MのNaCl中の1~4のビーズ懸濁液10μlを含むチューブ

ブに加えた。これらのチューブをLabquakeシューカー

（Lab Industries, Inc.）で1時間振盪させた。このチューブに0.1MのNaCl 10μl中の（「B」）-ビオチンを量を増やしながら（5~25μCi）加え、そしてこれら再び1時間にわたって振盪させた。チューブをDyna 87C-8 マグネット上に吸着して懸濁液からビーズを除去し、この上層液の10μlのアリコートを取り出し、そしてこれらの放射特性の値をBeckman LS 5500 TD液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。そのカウント数を、オリゴヌクレオチドを加えていないチューブのそれと対比した。他方、いくつかのプライマーに関しては、ビオチニル化は0.8Mの尿素の存在下における分析用ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて反応生成物のサイズ分別によってモニターした。

2-標的依存性プライマー伸長/停止反応。

約5μCiの（「B」）-ビオチニル化オリゴデオキシヌクレオチド標的（濃度範囲）を約3μCiのプライマーと、IXのシーケンシング試薬（Sequenase Version 3.0 キット、93 Biotechnical Corp. 由来）（最終容積10μl）の中で混合し、この混合物を65℃で2分間インキュベートし、次いで室温にまで冷却して、プライマーと標的をアニールさせた。アニールした標的-プライマーを含む溶液をAとBの5μlずつに2つに分け、これに以下のものを加えた：

反応物A（標準化用標準試薬）-100nMのジチオスレイトール 0.5μl、10μMのdATP、dGTP、dCTPをそれぞれ1μl、「B」標準試薬（Sequenase Version 2.0 キット、93 Biotechnical Corp. 由来）0.5μl、（³²S）-マーカ-477P（10μCi/μl、1180Ci/μCi）（DuPont-NEN）0.5μl、シーケンゼ1μl（1:8希釈、93 Biotechnical Corp.）；

反応物B（プライマー3'末端の伸長特異性ラベル化）-反応物A

の縮合物と同じ、ただし用いたヌクレオチドはdATP、dGTP、dCTP及び「B」-α-デキス-dATPとした。

反応は37度で5分とした。プライマー又はシーケナーを賣いたコントロールも実施した。アクリコートを取り出し、そして15%のポリアクリルアミド、8 Mの塩基のDHA シーケンシングゲルでの電気泳動により分析した (Haslatia, T. 6 Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)を参照のこと)。ゲルを10%のメタノール、10%の酢酸で固定し、Watson の3 BM紙で乾かし、そしてKodak E-00at 48 フィルムに感光させた。他方、液体シンチレーションカウンティングによる生成物の分析のため、ビオチニル化酵素又は酵素プライマーをシーケナー反応の前夜にて過剰量のM-289 ストレプトアビジンダイナビーズ (Dynal) に結合させた (結合条件については、図2の「1」、オリゴデキスヌクレオチドのビオチニル化」を参照のこと)。ビーズを0.1 MのNaClで3回洗って一体化されていないラベルを除去し、次いでシンチレーション液体を加え、そして液体シンチレーションカウンティングによって放射能を測定した。

3. オリゴヌクレオチド縮合反応生成物からの断片の作成。

オリゴヌクレオチド縮合反応 (PCR) の反応は、DHA の極少量にフランクする1又は複数の増幅プライマーを前夜の通りにビオチニル化させて行った。これらのプライマー (最終濃度2 μmol) 及び極量のDHA (1 μmol) を 1.5 μmolの Taqポリメラーゼ (Purkin Elong/Cetus), 200 μmolのdATP, dCTP, dGTP及びdTTP, 100mMのトリス-HCl (pH8.3), 5.0mMのKCl, 1.5mMのMgCl₂及び0.01%のゼラチン (Sigma) とインキュベートした。反応混合物の上にパラフィン油をかぶせ、そしてPurkin Elong/Cetus テーマライタで30分間におたってインキュベートした。反応生成物をフェノール/クロロホ

特許第6-505394 (18)

ルム抽出及びエタノール抽出により抽出し、次いでポリアクリルアミドゲルでの電気泳動の後ヒコチウムブルー染色によって分析した。二重PCR 生成物の量は典型的には約10 μgであった。

このPCR 生成物約5 μgを、0.1 MのNaCl中の予備洗脱したM-289 ダイナビーズの懸濁液50 μlと、ゆっくり攪拌しながら60分におたってインキュベートした。結合DHA (約15 μmol) を有するビーズを次に0.15 MのNaOHと25度で5分間インキュベートした。このビーズを0.15 MのNaOHで1回洗い、一体化していないDHA を除去し、次いでH₂O で3回洗った。このビーズをH₂O に再懸濁させ、ビオチン-ストレプトアビジン結合を介してビーズに結合した断片を異なるプライマー伸長反応物のための断片として用いた。

B. 実施例

実施例 1.

プライマーオリゴ 182:

5' GGCTTGGCTTGTGAGAA'

断片オリゴ

180(C)/181(T): 5' TGGCTTGGAGACCCAGATCTT/TATAGACTA'

オリゴヌクレオチド180及び181を、その5'末端に第一アミノ基を付加させて合成した。これらを前述の通りにビオチンと結合させた。オリゴヌクレオチド180をプライマーとしてアミールさせ、そして伸長反応「A」と「B」(図2参照) を実施した。オリゴヌクレオチド182に異なる予備洗脱断片3'-末端伸長を下記に示す(ヌクレオチドの前の「n」は放射能性ラベルを表す) :

断片	反応A	反応B
180	-48- ³² P-4A- ³² P-4AG	-44G
181	-4A- ³² P-4A- ³² P-4AG	- ³² P-4AG

従って反応「A」においては、両断片ヌクレオチドは放射能性ラ

ベルされた5個のヌクレオチドのプライマー伸長をもたらすであろう ; ラベル化の程度は反応系において存在している断片的にプライムされた断片の量に比例するであろう。反応「B」においては、両断片はプライマーの1個のヌクレオチド伸長をもたらすであろうが、しかしながらプライマーのラベル化において断片181に限定のみこのことが得られるであろう。従って反応「B」は、生産プライマー-断片複合体のDHA ポリメラーゼ縮合伸長を介するオリゴヌクレオチドの断片依存性配列特異性ラベル化の例である。

反応生成物を15%のポリアクリルアミド/8 Mの塩基のシーケンシングゲル上でサイズ分離し、そしてオートラジオグラフで露光した。結果(図1)は、予備通り、反応「A」が両プライマーのラベル化及び伸長をもたらす、他方、反応「B」が断片181に強く偏ったラベル化をもたらすことを示した。図1のパネルCはパネルBと同じ反応生成物のゲル分析を示すが、ただしその反応生成物はM-289 ストレプトアビジンダイナビーズを用いて露光した通りに表示物として示す。

実施例 2.

実施例1に記載の実験はオリゴヌクレオチドプライマー182の断片依存性ラベル化を示し、ここでそのラベル化はオリゴヌクレオチド又はポリアクリルアミドゲル上で同じように検出される他の物質に対して特異的である。ゲル泳動とは何関係に他の全てのラベル化物質に對するオリゴヌクレオチド182の断片依存性特異性ラベル化をより一般的に評価するため、一体化させた放射能性の断片的な測定を行った。この実験において、両方の反応「A」と「B」を行い、反応生成物をダイナビーズを用いて精製し、次いでアクリコートの全放射能性を液体シンチレーションカウンティングによって測定した。この手順は他の物質の中へのラベルの混入した一体化、及びそれに

加えて、一体化されていないヌクレオチドについてのダイナビーズ洗脱手順の効率の両方を評価せしめる。実験には、プライマーの特異的な断片依存性ラベル化を評価するための標準で、ゲルをベースとしない手順を得るために、再特異的なラベルの両面を最少限にすることが興味深いとされるであろう。断片ビーズに基づく洗脱後の反応生成物を直接的に計測する結果を下記に示す (全ての結果を³²Sのcpmとして表す) :

反応	断片 180	断片 181
A, 完全	325,783	441,883
A, オリゴヌクレオチドなし	5,187	5,416
A, プライマーなし	4,351	12,898
B, 完全	5,674	176,391
B, オリゴヌクレオチドなし	2,938	1,419
B, プライマーなし	1,629	1,268

これらの結果からわかる通り、プライマー182の特異的な断片依存性ラベル化は、未反応のヌクレオチドを取り除くための断片ビーズを用いた洗脱後の反応生成物の全放射能性を測定することによって決定することもできる。本実験におけるバックグラウンドは全ての起源に由来する非特異的なラベルに基づいて約3-4%である(「B, 完全」反応における断片180と181を比較のこと)。コントロール実験(「オリゴヌクレオチドなし」及び「プライマーなし」)は、バックグラウンドラベルの値が、洗脱工程によって完全に除去されなかった一体化されていないヌクレオチドにおそらく起因することを示す。「A, 完全」反応は、両方の断片に對する、生産断片: プライマー複合体が依存していることを示す。

実施例 3

2重断片の増幅プライマー、TGL105及びTGL208 (図2)を、2重断

特表平6-505394 (14)

のDNA 配列多形性を含む中DNA のクローン庫を増殖させるために用いた。位置114 にてA又はT、そして位置190 にてA又はG (図2)。これらの多形性を含むDNA は分子クローンされ、そして以下のプラスミドに基づいて獲得される。プラスミドp188, C114及びA190; プラスミドp624, T114及びA199; プラスミドp814, C114及びE190。ピオチニル化プライマーを伴う4通りのPCR 反応を行って、産物として利用するためのこれらのプラスミドの特定の位を増幅及び精製した。

プライマー	プラスミド	産出プライマー
105ピオチニル化	p188とp624	TGL182
106ピオチニル化なし		
106ピオチニル化なし	p188とp814	TGL166
106ピオチニル化		

二重体PCR 生成物を精製後電子に結合させ、NaOHで変性させ、そして前記の通りにピオチニル化液を精製した。ピオチニル化TGL105によって生成した産物をピオチニル化されていないプライマーTGL106によるDNA シーケンシングによる分析にかけ、存在している産物の量を測定した。同時に、ピオチニル化TGL106を用いて調製した産物をピオチニル化していないTGL105によるシーケンス化により分析した。

ほぼ等量の産物 (2 pmole) を多量産物型プライマー、TGL182とTGL166に65℃で5分間アニールさせた (前記及び図2を参照のこと)。これらのプライマーは産物に、配列特異的結合において水素結合し、それらの中 3' 末端はそれぞれ位置114 と190 のヌクレオチドの隣りとなっている (図2)。4種類のddNTP (その1つ (ddATP) はラベル化されている) の存在下においてこれらのプライマー-産物複合体に基づいて断片化型プライマー-伸長反応 (反応「B」条件) を

で重塩にまで30分かけてゆっくりと行うことによってアニールさせた。産物-プライマー-複合体を含むビーズをTBT 200 µl で2回洗い、続いて40mMのトリス-HCl, pH7.5, 20mMのMgCl₂, 50mMのNaCl 25 µl の中に再懸濁させた。

以下のddNTP 混合物を用いた:

5'-ラベル化ジデオキシヌクレオチド三リン酸混合物 (ラベル化ヌクレオチドはddNTPで示す):

ddG混合物: 5 µM ddGTP	10 µM ddATP	10 µM ddTTP
10 µM ddCTP		
ddA混合物: 10 µM ddGTP	5 µM ddATP	10 µM ddTTP
10 µM ddCTP		
ddT混合物: 10 µM ddGTP	10 µM ddATP	5 µM ddTTP
10 µM ddCTP		
ddC混合物: 10 µM ddGTP	10 µM ddATP	10 µM ddTTP
5 µM ddCTP		

ddNTPは4種のそれぞれの (α-³²P) ジデオキシヌクレオチド三リン酸である (New England Biolabs より購入)。

各ビーズ結合化産物プライマー-複合体につき、4通りの伸長反応を実施した (各ddNTP 混合物につき1反応)。伸長反応物は下記の成分を含んだ。アニールした産物プライマー-複合体を含む 5.0 µl のビーズ懸濁液、100mMのジチオスレイトール 0.5 µl 「Bn」阻害剤 0.5 µl (100mMのNaCl, 150mMのDL-イソソルトレート, pH7.0; U.S. Biochemicals, Cleveland, Ohioより購入)、1.0 µl のddG, ddA, ddT 又はddC 混合物、2.0 µl のH₂O 及び 1.0 µl のT7 DNA ポリメラーゼ (「シーケナー」バージョン2.0, U.S. Biochemicals, 50mMのトリス-HCl, pH7.5, 10mMの2-メルカプトエタノール, 1mg/mlの牛血清アルブミン中で1625単位/µl)。

行った。これらの伸長反応生成物を15%のポリアクリルアミド/8 Mの尿素のゲルでの電気泳動、それに続くオートラジオグラフィによって分析した (図3)。

実施例4

プライマーオリゴTGL181: 5'-TCGTTTGCACAAAGCA-3'

プライマーオリゴTGL246: 5'-GTTTTCACAAAGCA-3'

産物オリゴ TGL282: 5'-CACAAAGCGTGTTCGTGCA-3' -

ピオスチン: (ストレプトアビジンビーズ)

オリゴヌクレオチドTGL282をMidland Certified Reagent Company, Midland, Texasより購入した。これを5' 末端ヌクレオチド位置において、自動化学法に於ける利用に適するMidland Certified Reagent Company の「ピオスチン」試薬 (ピオスチン誘導型ホスホアミド) を用いてピオチニル化した。次にこのピオチニル化オリゴヌクレオチドを陽イオン交換RPLCにより精製した。ストレプトアビジン結合化M-280 ダイナビーズをTBT阻害剤 (10mMのトリス-HCl, pH7.5, 100mMのNaCl, 1mMのEDTA, 0.1%のトリトンX-100) で洗い、そして同じ緩衝液の中で7 × 10⁶ ビーズ/mlの濃度において再懸濁させた。10~100µmolのピオチニル化オリゴヌクレオチドTGL282をTBT中の 100 µl のダイナビーズ懸濁液と30分間でインキュベートして、ピオチン成分をストレプトアビジンに結合させた。このビーズを次に (それらを固定する岩石を用いて) 200 µl のTBTで3回洗い、そして 100 µl のTBTに再懸濁させた。アニール化のため、付加した産物オリゴヌクレオチドを有するダイナビーズのこの懸濁液25 µl を岩石で固定し、TBTを除去し、そして2 µMのオリゴヌクレオチドプライマー346 又は391 を含む40mMのトリス-HCl, pH7.5, 20mMのNaCl, 50mMのNaCl 25 µl を加えた。この産物及び各プライマーを65℃で5分間インキュベートし、次の

反応を20℃で15分間行わせ、次いで50 µl のTBTで8回、産物固定化ビーズを洗うことにより停止させた。これらのビーズを産物アッセイ前に25 µl の産物量のTBTの中に再懸濁させた。

プライマー伸長反応によるラベル化ジデオキシヌクレオチドの一体化を2通りの方法、即ち、ゲル電気泳動、それに続くオートラジオグラフィ、及びラベル化DNA の直接オートラジオグラフィによりアッセイした。

1. ゲル電気泳動、それに続くオートラジオグラフィ (5'-ラベル化物質のみ)。洗浄せしめたビーズ結合化DNA を10 µl のホルムアルデヒド緩衝液 (80%のホルムアルデヒド、10mMのトリス-HCl, pH8, 1mMのEDTA, 0.02%のプロピフェノールブルー) の中で94℃で5分間加熱し、そしてプライマー-産物複合体からラベル化プライマーを遊離させた。サンプルは又は12.5%のポリアクリルアミド/8 Mの尿素シーケンシングゲル (19:1のアクリルアミド:ビスアクリルアミド比; 100mMのトリス-HCl, 100mMのボレート, 2mMのEDTA, pH8.8 のランニング緩衝液; 80ワットの定常出力) での電気泳動により分析した。電気泳動後、ゲルを硝酸紙上で乾かすか、又は-70℃で凍結して広電を待たせ、プラスチックラップをかき、そしてX線フィルムに曝露して、オートラジオグラフィによりラベル化DNA を可視化させた (図4)。

2. ラベル化DNA の直接オートラジオグラフィ分析。

ビーズに対する金放射能性結合の分析のため、TBT中のビーズ懸濁液の10 µl のアリコートは硝酸紙又はナイロン膜上に乾燥スプレッドした。フィルター又は膜を自動電圧のもとで乾かし、プラスチックラップをかき、そしてX線フィルムに曝露した (図5)。

実施例5

TGL240: 5'-AGATGATGCTTTTGTGCAAGAC-3'

特表平6-505394 (16)

TEL239: 5' TCATACCTGACGTCGACACGCTG 3'
TEL308: 5' AGCTTCAGACGCTGCTGCTGCT 3'

オリゴヌクレオチド FTEL240 を、その 5' 末端に第一アミノ基を付与し、そして前記した通りピオチンと重合させて合成した。TEL240 (ピオチニル化) 及び TEL239 (ピオチニル化されていない) を、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (A. 一般的方法) を参照のこと) を介して哺乳動物ゲノム DNA のサンプル中の特定の遺伝子座を含んで成る DNA 領域を増幅させるために利用した。それぞれが特定の塩基の塩基化配列多量体 (「A」対立遺伝子及び「B」対立遺伝子-図 6 参照のこと) に対してホモ接合体である 2 種類の別々の個体由来する DNA を調べた。PCR 反応の後、3~20µmol の二重鎖 PCR DNA を TBE 緩衝液中で 100µl のストレプトアビジン結合化 M-280 ダイナビーズ (1×10¹⁰ ビーズ/ml) とインキュベートして、ビーズにピオチニル化鎖を結合させた。結合後、ビーズを磁性的に固定化し、200µl の TBE で 3 回洗ひ、次いで 100µl の TBE に再懸濁させた。ピオチニル化されていない個体を除去するため、0.15N の NaOH 500µl を加え、次いでこの懸濁物を 20℃ で 30 分間インキュベートした。これらのビーズを磁性的に固定化、そして 0.15N の NaOH 250µl で 1 回、500µl の TBE で 3 回洗ひ、次いで 100µl の TBE に再懸濁させた。

検出プライマーであるオリゴヌクレオチド TEL308 (図 6) を実施例 4 に記述の通りにビーズ結合化 PCR 作製時にアニュアルさせた。異なる検出、伸長反応及び検出アッセイも実施例 4 に記述の通りに実施した。2 種類のホモ接合体、333164 (「11」ゲノタイプ) 及び 333164 (「11」ゲノタイプ) についてのラベル化プライマー伸長生成物のゲルオートラジオグラフィ分析を図 7 に示す。ホモ接合体の塩基配列特性又は NaOH 処理後のプライマー合金化放熱特性の

5' GCAGGAGCTGGAAGTACTGCTTTCCT 3' とした。ウマ遺伝子座の第 2 局所塩基は入れ子プライマー #239:

5' TCATACCTGACGTCGACACGCTG 3' 及び #240:

5' AGCTTCAGACGCTGCTGCTGCT 3' を用いて行った。

HLA DPA1 配列 (Marsh, S.G.H., Bodmer, J.G. HLA Class II Evolutionary Sequences, 1991, Immunol., 31:227-237) はプライマー #457:

5' GCGACCATGTGTCAACTTAT 3' 及び #458:

5' GCTTACCTGCTCTTCAAGCTG 3' により得た。

検出の調製。ゲノム配列の増幅はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて実施した (Gelb, H.E., Gelfand, B.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Nollis, R.D., Erlich, H.). Primer Directed Synaptic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase, Science 239:487-491). 第 1 工程において、100ng のゲノム DNA を、各第 1 局所プライマーを 2µM / 10µM のトリス pH 8.3 / 50mM の KCl / 1.5mM の MgCl₂ / 0.1% のゼラチン / µl 当たり 100 単位 / 50µl のポリメラーゼ (AmpliTaq, Perkin Elmer (etus, Norwalk, CT) 0.05 単位 / 50µl の温度で含む、反応混合物の中で用いた。反応物を調製、そして 94℃ で 1.5 分、続いて 94℃ / 1 分を 30 サイクル、50℃ / 2 分、72℃ / 3 分インキュベートした。第 2 「検出反応」 PCR (その中には第 1 反応の生成物が 1 / 1000 に希釈されている) において一本鎖 DNA が調製された。これらのプライマーのうちの 1 つは 2µM の標準濃度で用い、そして他方は 0.08µM で用いた。これらの条件のもとで、反応中に一本鎖及び二本鎖の両方の分子が合成された。

検出の調製。30穴プレート (Nunc Nuncion プレート、Forkhilde, Denmark) において DNA 反応を行った。ウェル当たり、5'

オートラジオグラフィ分析を、フィルタースポットティングアッセイを用いて、これらと同一の個体について示す (図 8)。プライマーのみの分析については、0.4N の NaOH 10µl を 10µl のビーズ懸濁液に加えた。室温で 10 分間インキュベートした後、これらのビーズを磁性的に固定化し、そしてその上清液を置き取り、次いでナイロンプロットング膜の上にスポットした。

実施例 8 遺伝子型分析

DNA サンプル。ゲノム DNA を、血液を 3 倍過剰容積の ACE 溶剤緩衝液 (0.15M の塩化アンモニウム、1mM の炭酸水素ナトリウム、0.1mM の EDTA) で希釈することによって行われる塩析の過程によって赤血球から高化せしめたヒト又はウマの検体血液から抽出し、50µl / プロテイナーゼ K 手順 (Maniatis, T. の Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989) を利用して単離した。オリゴヌクレオチドは Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA) モデル 391 自動 DNA 合成装置を利用し、固相ホスホアミド化学により調製した。遺伝子型分析 (GBA) 反応において用いるプライマーの場合は、合成の最終サイクルの後にトリメチル化を行わず、そして金銀オリゴヌクレオチドは Applied Biosystems オリゴヌクレオチド製造カートリッジ (OPC) を用い、その製造業者の推奨する通りに調製した。ほとんどの PCR 反応については、プライマーは既述の検出物を結合することによって直接利用した。5' アミノ基の保護されたオリゴヌクレオチドは、Applied Biosystems より購入したアミノラジング 2 をその製造業者の推奨に従って用いて前処理した。

オリゴヌクレオチド配列。ウマ遺伝子座 27185 の第 1 局所塩基のためのプライマーは #21:

5' CCTCTCAGAGTCCACTGCTGCTGAG 3' 及び #22:

アミノ基を有する 10µmol のプライマーを、8mM のリン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.5、20mM の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) の中で、室温で一晩インキュベートすることによって DNA プライマーをプレートに共有結合させた。結合後、このプレートを 10mM のトリス pH 7.5 / 150mM の NaCl / 0.05% の Tween 20 (TBE) で 3 回洗った。

ピオチニル化 dATP。ピオチニル化 dATP を米国特許第 5,047,519 号に従って合成した。

マイクロウェルプレート中での DNA。96穴プレートに共有結合したプライマーへの一本鎖 DNA のハイブリダイゼーションを、等量の 5M の NaCl / 50mM の EDTA を第 2 局所検出反応 PCR に付加し、次いで各ウェルを 20µl のこの混合物と 55℃ で 30 分間インキュベートすることによって行った。このプレートを次に TBE で 3 回洗った。dATP (3mM) のうちの 1 つはピオチニル化 / 5mM の dATP / 7.5mM の イソクエン酸ナトリウム / 5mM の NaCl / µl 当たり 0.04 単位の塩化 17 DNA ポリメラーゼである) を含む 20µl のポリメラーゼ伸長混合物を室温で 5 分間インキュベートした。ウェルを 0.2N の NaOH 50µl で室温で 5 分間インキュベートし、次いでウェルを更に 0.2N の NaOH 50µl で洗うことにより検出物を除去した。このプレートを次に TBE で 3 回洗った。ピオチニル化 dATP の一体化を陽性結合アッセイにより測定した。各ウェルを室温で 30 分間調製しながら 30µl のストレプトアビジン-結合化西洋菜タビベルオキシンゲ (BRL, Gaithersburg, MD より購入した製品) の TBE における 1 / 1000 希釈液とインキュベートした。TBE で 3 回洗った後に、

0.512M の NaOH を含む 100µl の O-フェニレンジアミン (OPD, 0.1M のクエン酸、pH 4.5 中で 1mg/ml) を各ウェルに加えた。結合した酵素の量は、反応を停止させた後にプレートを調製すること

特表平8-505394 (16)

により、又はモレキュラー デバイス モデル「Voss」95穴分先光度計を用いて定量的に決定した。

この手順の一貫性を保証するため、2種類の異なる標型分子上にある3種類の異なる部位を分離する能力を示す。図9~11の中央には、これらの遺伝子座の多形領域を、DHA サンプルのゲノタイプのために用いたDHA プライマーの配列と共に示す。試験DHA サンプルのゲノタイプは予め、制限分析及びゲル電気泳動（ウマのサンプル）又は対照分子特異的ハイブリダイゼーション（ヒトのサンプル）を用いて決定している。

図9~11の上及び下は、これらの部位の多形性DHA 分析の写真である。「プラス」値（これはDHA DPA1についてのDPA1に相当するが、ウマ遺伝子座DPA5のために任意的に選択されている）の分析を画面上方に示し、そして「マイナス」値の分析は下方の写真に示している。西洋ワサビペルオキシダーゼ活性を用いて、ゲノタイプデータをも系統的に鑑別した。同様にDHA のための適当な標型であるため、2種類の異なるプライマーを用いることによりゲノタイプの鑑別をすることが可能であった。DHA DPA1遺伝子座については、2つの部位のポリマー化が分離された（図9と10）。同一性の結果が得られた。ウマの遺伝子座DPA5を包括する別の実験の分先光度計を画12に示す。獲得されたシグナル、対、不適切な塩基の一体化の平均値は62.2であった。

C. 原理

本発明を実施するための方法の一例は、好適な塩基、例えば塩酸、上成炭酸、毛髪又はその他の組織からDHA 又はDPA のサンプルを調得し、次いでポリマーゼ連鎖反応反応ベース増幅（Kozakら、Proc. Natl. Acad. Sci. 80:11173(1983)等を用いてインビトロで塩基の特定の領域を増幅させることを包括する。増幅は、アフィニティー面

を有することにより改良された1又は複数のプライマーを用いながら、対象の領域にフランクする特定のプライマーを用いて行われる（しかしながら任意の一定の反応においては、かかるプライマーのうちの1個のみが一度に改良される）。好ましい改良は、プライマーの3' 末端へのビオチン成分の連結である。増幅サンプルのサンプル（典型的には0.5~5 pmole）を次に、この増幅プライマー上の連結ビオチン成分を介してストレプトアビジン-複合体抗体分子（例えばYsal B-200「ダイナビーズ」）に結合させる。この微小球を含む水性懸濁液を十分にアルカリ性pHに調整することによってこのDHA を変性させ、そしてビオチン-ストレプトアビジン結合を介してこの微小球に結合した複合体を初期のアルカリ性条件のもとで洗うことにより増幅産物から分離させる。これを成し遂げるため、これらの微小球を遠心するか、又は磁場の適用により固定化させる。この微小球結合複合体に繰り返しの操作において繰り返し用いた。

上記のようにして作り上げた増幅産物、高純度アニーリング条件のもとで特異的なプライマーオリゴヌクレオチドに結合した（このプライマーの配列は既知のDHA 配列多形性のすぐ隣の増幅産物の部位への固有の結合性を含む）。好ましい配列及びプライマーに対する結合の増加は、このプライマーが既知と二重体を形成し、従ってこのプライマーの3' 末端のヌクレオチドがこの配列多形性における第1ヌクレオチドの部位のすぐ隣の既知ヌクレオチドと、その二重体が分析されるべき多形性配列の置換を伴うことなくウツソン、クリック塩基対を形成することを改良した。このプレジグメントは、プライマーの増幅決定性DHA ポリマーゼ連鎖反応を介して付加された標型における多形性ヌクレオチド配列の隣のヌクレオチドが明確に決定されることをもたらす。

上記のプライマー：既知結合体を、増幅決定性DHA 塩基に適合す

る塩、pH及び温度の条件のもとで、適当なDHA ポリマーゼ及びこの標型における塩基と特異的な塩基対を形成することがわかっている4種類の異なる塩基停止ヌクレオチド類似体と結合させた。ほとんどの場合、しかしながら必ずしも必要はないが、この増幅及び塩基停止類似体における塩基は一般的なヌクレオチド、即ち、アデニン、シトシン、グアニン又はイノシン、チミジン又はウリジンを含むとする。塩基停止類似体の好ましい例は4種類のジデオキシヌクレオチド三リン酸、ddATP、ddCTP、ddGTP 及びddTTP であり、ここでこの4種のddNTP それぞれは異なる蛍光ラベルの連結によって改良されている。これらの蛍光タグは分光学的に鑑別できる放射スペクトルを有する特性が備っており、そしてどの場合もジデオキシヌクレオチド三リン酸の改良は塩基停止類似体をプライマーの3' 末端へのDHA ポリマーゼ連鎖反応一体化にとって不適切なものにしないであろう。かかるプライマー：既知結合体を含むかかる混合物におけるDHA ポリマーゼ連鎖反応増幅の結果は、プライマーの3' 末端上への蛍光塩基停止類似体の定量的、特異的、そして正確な一体化であり、付加された特定の蛍光性ヌクレオチドは標型における多形性ヌクレオチドの配列によってのみ示される。

塩基置換にまだ結合したままの蛍光物質を取り下げたプライマー：既知の結合体を次に、例えば磁性的に固定化されたビーズを含む緩衝液の中で洗うことにより、一体化されていないヌクレオチドを含む反応混合物から分ける。更に、一定の状況においては次にこのプライマーを固定化標型からDHAによって増幅させ、増幅させたプライマーを別のメディアウム又は装置に移し、その後一体化されたターミネーターの同一性を決定することが所望される。次いで増幅された蛍光産物の同一性を、好ましくは適当な増幅及び増色のレーザーにより供される光をこの改良DHA 標型に当て、そして生ずる放

射スペクトルを分光学的に分析することによって評価する。一般に、DHA 配列におけるいずれかの一定の部位での2つの対立遺伝子（二重体）に関して、16通りの可能な塩基対及びヘテロ二重体対に対応して生ずる16通りの可能な近接（consensus）放射スペクトルがある。測定したスペクトルと標準スペクトルのこのライブラリーとを置置に合わせることで、どの塩基停止ヌクレオチドがプライマーの3' 末端に付加されたかを決定すること、それ故、標型における配列多形性の性質を決定することが可能となる。多量対立遺伝子系又は1:1以外の比率において存在している対立遺伝子により生ずるスペクトルも、等量ヌクレオチドそれぞれの相対比を決定及び評価するために適当な数学的処理によって解かれる。

上記の工程は全て、自動化することのできる又はされている化学系、操作及びプロトコルを包括する。それ故、本発明の好ましい実施態様を自由にプログラムされたロボットワークステーションに組み込むことは、生物学的サンプルに由来する試料における特定のヌクレオチド配列又は配列順序の決定に依存する事実上全ての診断手順にとっての有意義な費用節約及び効率の上昇をもたらすであろう。

上記の方法のいくつかの特徴は本発明の好ましい態様を改善、且つ、簡便する。特に、好ましい態様である塩基ビット分析（GBA）はより好都合な態様を提供する。塩基置換は増幅的増幅及びその増幅のために注意を払って取られるべきである。従って、これらのビーズを利用する容量の高い自動化アッセイをもくろむことは難しい。更に、それらの色は暗く、従って増幅又は蛍光アッセイには適さない。

GBA 方法論は標準のポリスチレン96穴マイクロプレートの利用も可能にするために採用される。これらは臨床及び臨床研究におい

配座の方法において、該結晶は置換上、この結晶の固定化を可能とするように結晶化されたプライマーを用いるPDIによって作られ

<u>プラスミド</u>	<u>ヌクレオチド₁₁₄</u>	<u>ヌクレオチド₁₂₀</u>
p227	C	A
p624	T	A
p814	C	G

FIG. 1A FIG. 1B FIG. 1C

特許平6-505394 (19)

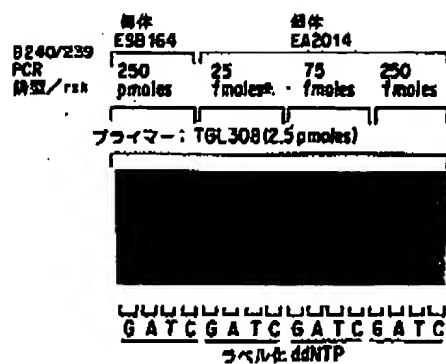


FIG. 7

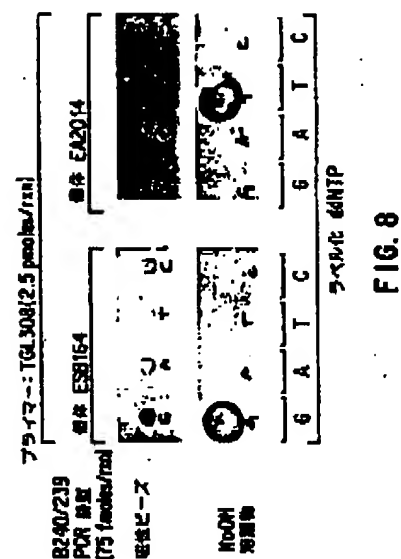


FIG. 8

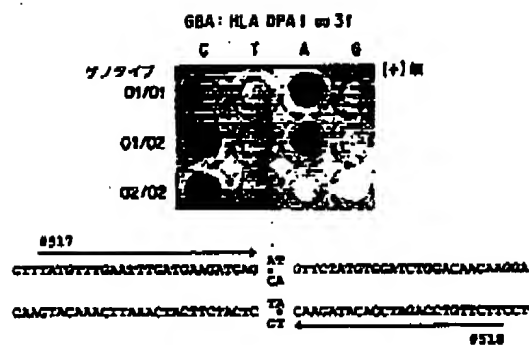


FIG. 9

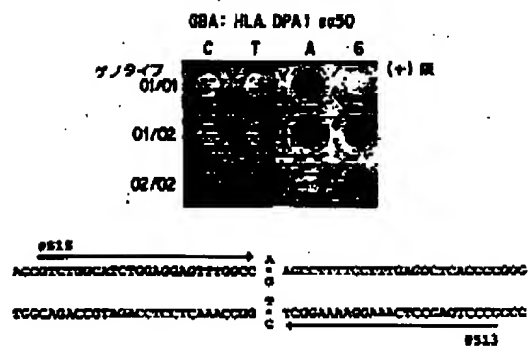


FIG. 10

品名	规格	单位
----	----	----

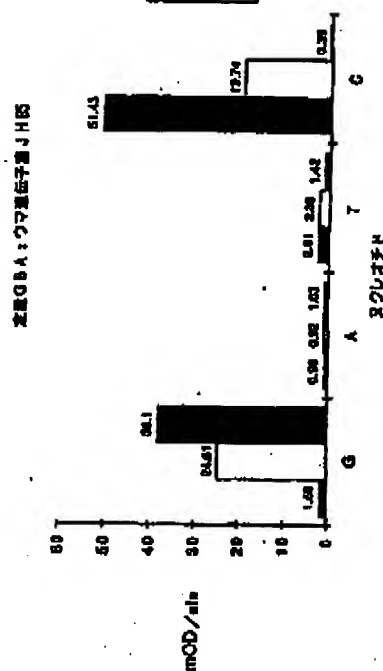


Figure 12

全書9冊A：ウツ病を生き抜く1冊

[illegible]

71357

	C	T	A	G	(-) M
AA					
AB					
BB					

FIG. 11

● ● ● ● ●

[illegible][illegible]

特表平6-505394 (21)

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N
L, SE), AU, CA, FI, JP, NO

(72)発明者 アンダーソン, スティーブン
アメリカ合衆国, ニュージャージー
08540, プリンストン, スプリングデール
ロード 158

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.